



**Universidad Andrés Bello**  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Escuela de Ingeniería en Biotecnología

**“Búsqueda racional y análisis de actividad biológica de nuevos activadores del canal  
TRPV1, análogos a capsaicina”**

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar  
al Grado de **Magíster en Biotecnología**.

**Profesor patrocinante: Dr. Fernando Danilo González Nilo**  
**Centro de Bioinformática y Biología Integrativa**  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Andrés Bello

**Javier Cáceres Molina.**  
**Santiago, Chile.**  
**Septiembre, 2016.**



## **I. Dedicatoria:**

Si bien el presente trabajo nace desde el esfuerzo académico de su autor y de quienes contribuyeron intelectualmente en su construcción, existe un factor no cuantificable que es determinante. De este modo se puede decir que todo esfuerzo es análogo a un árbol, el cual tiene su origen en una semilla y dando sus frutos años más tarde producto de la dedicación constante. En esta ocasión, quisiera dedicar a quienes plantaron esta semilla y que son las mujeres más importantes en mi vida, mi madre Ingrid Molina Alarcón y mi abuelita Hilda Alarcón (Fallecida en 2008). Gracias por sus años de sacrificio, de apoyo constante, por enseñarme el valor del trabajo y por enseñarme a ser un hombre humilde, bondadoso e íntegro. Con pocos recursos siempre me dieron mucho de lo más relevante, amor y dedicación. Siempre las llevo en mi corazón.

## **II. Agradecimientos:**

En el círculo profesional, me gustaría agradecer a mi profesor, el doctor Fernando Danilo González por confiar en mi y darme un espacio en el CBIB para poder desempeñar mi tesis. Me gustaría agradecer además al doctor Ramón Latorre por su valioso feedback durante el desarrollo de este trabajo y en la búsqueda del conocimiento. Se suman a los agradecimientos mis profesores de la comisión evaluadora, quienes con sus comentarios en la revisión del anteproyecto me abrieron nuevas perspectivas para el desarrollo de la presente tesis.

Este trabajo fue financiado por Proyecto FONDECYT Regular 1131003. El Centro Interdisciplinario de Neurociencia de Valparaíso (CINV) es un Instituto Milenio soportado por la Iniciativa Científica Milenio del Ministerio de Economía, Fomento y Turismo (09-022-F).



Mediante el siguiente texto me gustaría expresar mi agradecimiento primero a mi círculo personal, quienes contribuyeron a la posibilidad de llegar a esta instancia. Primero me gustaría agradecer a mi familia, partiendo por mi madre Ingrid Molina y mi abuela Hilda Alarcón, quienes son las que me enseñaron el valor del esfuerzo. Mis tíos: Michel Flores, Ivis Molina, mi tía Ely y mi tío Ricardo, quienes con cariño se han hecho presente en todas las etapas de mi desarrollo. Me gustaría agradecer de manera especial a mi Papo, por su compromiso con mi formación y sus consejos.

Quería agradecer además a mi familia del CBIB, tanto a mis parientes del tercer piso como Romina, Camila, Ignacio, Chino, Ingrid, Vane, Vale, entre otros por su feedback constante y buena onda. A mis parientes del laboratorio de microscopía: Javier, Maca, Belén, Simón, Jaime, Anita, Arlette y a su jefe. Gracias por las risas, los relajos, los tecitos y los completos. Finalmente y no menos importante, a mi familia del cuarto piso, a Bascur, Jose, Pola, Germán, Cata y Danny. Gracias por todo chicos, las cervezas, los viajes, los Pastabasillus spp. y las pepas (daaah).

### **III. Índice:**

<b>I. Dedicatoria</b>	<b>3</b>
<b>II. Agradecimientos</b>	<b>4</b>
<b>III. Índice</b>	<b>6</b>
<b>IV. Índice de Figuras</b>	<b>8</b>
<b>V. Abreviaturas</b>	<b>9</b>
<b>VI. Anexos</b>	<b>88</b>
<b>1. Resumen</b>	<b>13</b>
<b>1. Abstract</b>	<b>14</b>
<b>2. Introducción</b>	<b>15</b>
2.1. Terminales sensoriales primarios	15
2.2. Desde el potencial de acción a los canales iónicos	16
2.3. La familia de canales de potencial transiente ‘TRP’	19
2.4. Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1)	20
2.5. TRPV1 como blanco farmacológico relevante en el tratamiento del dolor	28
2.6. Agonistas de TRPV1 como agentes analgésicos	30
<b>3. Hipótesis</b>	<b>34</b>
<b>4. Objetivos</b>	<b>34</b>
4.1. Objetivo General	34
4.2. Objetivos Específicos	34
<b>5. Metodología</b>	<b>35</b>
5.1. Preparación del receptor protéico y de ligandos pequeños	35
5.2. Simulación de acoplamiento molecular de capsaicina	36
5.3. Acoplamiento molecular masivo	37
5.4. Búsqueda de las características químicas relevantes de capsaicina involucradas en la interacción proteína-ligando	37
5.5. Selección de compuestos para validación experimental	38
5.6. Validación experimental	41
5.7. Simulación de dinámica molecular de capsaicina y el mejor análogo en membrana	41
<b>6. Resultados</b>	<b>43</b>
6.1. Predicción del modo de unión de capsaicina	43
6.2. Resultados del acoplamiento molecular masivo	47
6.3. Selección de los mejores candidatos	48
6.4. Validación experimental	50

6.5 Comportamiento de capsaicina y el mejor análogo en membrana	51
<b>7. Discusión</b>	<b>53</b>
7.1. Acoplamiento molecular para la predicción del modo de unión de capsaicina	53
7.2. El modo de unión predicho guarda buena relación con los datos experimentales	56
7.3. Correlación entre las estructuras de los compuestos líderes y el modo de unión de capsaicina	59
7.4. Los ligandos líderes muestran una buena actividad in vitro y se correlaciona con las predicciones in silico	62
7.5. Nuevas perspectivas sobre la farmacología asociada al canal TRPV1	64
<b>8. Conclusiones</b>	<b>67</b>
<b>9. Bibliografía</b>	<b>69</b>

#### **IV. Índice de Figuras:**

<b>Figura 1.</b> Tipos de aferentes sensoriales primarios	<b>17</b>
<b>Figura 2.</b> Características estructurales de capsaicina	<b>23</b>
<b>Figura 3.</b> Detalles estructurales de TRPV1 obtenidos mediante criomicroscopía electrónica	<b>24</b>
<b>Figura 4.</b> Sitio sugerido de unión a compuestos vaniloides	<b>26</b>
<b>Figura 5.</b> Compuertas del canal TRPV1	<b>27</b>
<b>Figura 6.</b> Correlación estructura-función de ligando y el segmento S6-TRP	<b>28</b>
<b>Figura 7.</b> Representación de una simulación de acoplamiento molecular ( <i>docking</i> )	<b>32</b>
<b>Figura 8.</b> Esquema del diseño de la estrategia computacional implementada	<b>40</b>
<b>Figura 9.</b> Acoplamiento molecular de capsaicina	<b>43</b>
<b>Figura 10.</b> Confórmeros definidos para la identificación del mejor modo de unión de capsaicina	<b>44</b>
<b>Figura 11.</b> Determinación del modo de unión más probable de capsaicina	<b>45</b>
<b>Figura 12.</b> Diagrama de las interacciones identificadas para capsaicina	<b>46</b>
<b>Figura 13.</b> Ligandos seleccionados para validación experimental	<b>50</b>
<b>Figura 14.</b> Registros electrofisiológicos de las corrientes de TRPV1 dependientes de agonista	<b>51</b>
<b>Figura 15.</b> Comportamiento de capsaicina y el mejor análogo en la membrana	<b>52</b>
<b>Figura 16.</b> Comparación estructural entre capsaicina y las moléculas seleccionadas	<b>61</b>
<b>Figura 17.</b> Relación entre energía libre de unión teórica y experimental	<b>64</b>
<b>Tabla 1.</b> Mejores resultados del acoplamiento molecular masivo	<b>49</b>
<b>Tabla 2.</b> Resultados de la búsqueda de moléculas que satisfagan el modo de unión de capsaicina	<b>47</b>
<b>Figura suplementaria 1.</b> Densidades electrónicas atribuída a los ligandos identificadas en el sitio de unión a vaniloides en TRPV1 por criomicroscopía electrónica	<b>88</b>
<b>Figura suplementaria 2.</b> Comparación entre el modo de unión de Capsaicina y Capsacepina	<b>88</b>
<b>Figura suplementaria 3.</b> Estructura de los ligandos mostrados en la Tabla 1	<b>89</b>
<b>Figura suplementaria 4.</b> Comparación del bolsillo de unión a vaniloides en ausencia y presencia de agonistas	<b>90</b>
<b>Figura suplementaria 5.</b> Interacciones observadas entre el anillo de capsaicina y el anillo aromático de TYR511	<b>91</b>

## **V. Abreviaturas:**

#

°C: Grados celsius

**ΔG:** Cambio en la energía libre

**ΔLogP:** Diferencia en coeficiente de partición octanol-agua

**μM:** Concentración micromolar

**2D:** Dos dimensiones

**3D:** Tres dimensiones

**A**

**Å:** Angstrom

**ACh:** Acetilcolina

**Ag:** Átomo de plata

**AgCl:** Cloruro de plata.

**ALA:** Alanina

**B**

**Bk:** Canal de potasio de alta conductancia (Big Potassium)

**C**

**Ca<sup>2+</sup>:** Ión calcio divalente

**CaCl<sub>2</sub>:** Cloruro de calcio

**CAP:** Capsaicina

**Ca<sub>v</sub>:** Canal de calcio dependiente de voltaje

**cDNA:** Ácido desoxiribonucleico complementario

**CGenFF:** CHARMM General Force Field

**CHARMM:** Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics

**CINV:** Centro Interdisciplinario de Neurociencias de Valparaíso

**CPZ:** Capsacepina

**cRNA:** Ácido ribonucleico complementario

## **D**

**DkTx:** Toxina de doble nudo

**DRG:** Ganglio de la raíz dorsal (Dorsal Root Ganglion)

## **E**

**EC<sub>50</sub>:** Concentración efectiva media.

## **G**

**GLU:** Glutamato

**GLY:** Glicina

## **H**

**Hepes:** ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinmetanosulfónico

## **I**

**IASP:** International Association for the Study of Pain

**ILE:** Isoleucina

## **K**

**K<sup>+</sup>:** Ión potasio monovalente

**kcal/mol:** Kilocalorías por mol

**KCl:** Cloruro de potasio

**K<sub>d</sub>:** Constante de disociación.

**K<sub>v</sub> :** Canal de potasio dependiente de voltaje

## **L**

**logP<sub>oct/wat</sub>**: Coeficiente de partición octanol-agua

## **M**

**MET**: Metionina

**MgCl<sub>2</sub>**: Cloruro de magnesio

## **N**

**Na<sup>+</sup>**:IÓN sodio monovalente

**Na<sub>v</sub>**: Canal de sodio dependiente de voltaje

**NaCl**: Cloruro de sodio

**NaOH**: Hidróxido de sodio

**ns**: Nanosegundos

## **O**

**OPLS-AA**: Optimized Potential for Liquid Simulations - All Atom

## **P**

**P<sub>o</sub>**: Probabilidad de apertura

**PDB**: Protein Databank

**pH**: Concentración de protones.

**POPC**: 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina.

## **R**

**RMSD**: Desviación de la raíz cuadrada media (Root Mean Square Deviation)

**RTx**: Resiniferatoxina

## **S**

**SAR:** Relación estructura-actividad (Structure-Activity Relationship)

**SER:** Serina

## **T**

**TEVC:** Two Electrode Voltage Clamp

**THR:** Treonina

**TRP:** Receptor de potencial transiente (Transient Potential Receptor)

**TRPV1:** Receptor de potencial transiente vaniloide 1 (Transient Potential Receptor Vanilloid 1)

**rTRPV1:** Canal TRPV1 de rata (rat TRPV1)

**hTRPV1:** Canal TRPV1 de humano (human TRPV1)

**TTX:** Tetrodotoxina

**TYR:** Tirosina

## **V**

**VAL:** Valina

**$V_m$ :** Potencial de membrana

**VMD:** Visual Molecular Dynamics.

**VR1:** Vanilloid Receptor 1



## **1. Resumen:**

La supervivencia de un organismo está directamente relacionada con su capacidad de percibir e interpretar de manera adecuada su entorno. Esta tarea es realizada por el sistema nervioso mediante la activación de un subgrupo de neuronas sensoriales primarias, las que interpretan estos estímulos, transformándolos en impulsos nerviosos. Cuando un estímulo de naturaleza química, mecánica o térmica supera un umbral de intensidad definido, se genera una respuesta dolorosa aguda, proceso conocido como nocicepción. Durante décadas se utilizó a capsaicina, compuesto picante del ají, como agente farmacológico específico para la caracterización funcional de terminales sensoriales primarios. Su actividad selectiva sugería la existencia de un receptor específico para este compuesto, lográndose la identificación de un canal relacionado a la familia de canales de potencial transiente (TRP) a partir de células del ganglio de la raíz dorsal (DRG) de rata. Los receptores de potencial transiente o TRP se encuentran involucrados en procesos de transducción sensorial de prácticamente todos los organismos multicelulares, siendo el canal TRPV1 el primer miembro de esta familia en ser asociado a procesos de generación de dolor. La modulación de la actividad del canal por antagonistas y la insensibilización por la aplicación de agonistas de alta potencia, ha mostrado ser una estrategia efectiva para el tratamiento del dolor, pero no han sido fructíferas debido a los efectos adversos presentados en los individuos tratados. Esto abre la necesidad de la identificación mediante estrategias de búsqueda racional de nuevas moléculas, las que puedan servir como pistas para el desarrollo de terapias analgésicas mas eficaces y seguras. De este modo, tomando ventaja de las estructuras tridimensionales del canal TRPV1 publicadas, el presente estudio pretende aprovechar el poder de cómputo disponible para así aventurarnos en el desarrollo de una estrategia computacional, soportada con validación experimental, para la identificación de nuevos activadores del canal TRPV1 con el fin de aportar con nuevos compuestos líderes, más potentes que capsaicina, como punto de partida para la generación de nuevas terapias analgésicas. Además, mediante la caracterización de los determinantes moleculares que median la interacción de ligandos agonistas con el canal, se espera continuar contribuyendo al entendimiento sobre el mecanismo de activación dependiente de ligando del canal TRPV1.

## **1. Abstract:**

An organism survival is directly influenced by its capacity to perceive and interpret its surroundings in an adequate way. This task is performed by the nervous system, by activating a subgroup of primary sensory neurons, which interpret those stimuli, transforming them in an action potential. When a stimulus of chemical, mechanical or thermal nature surpasses a threshold of determined intensity it generates an acute pain response, process known as nociception. Capsaicin, the pungent compound of chili peppers, has been used for decades as a specific pharmacological agent for the functional characterization of primary sensory terminals. Its selective activity suggested the existence of a specific receptor for this compounds, allowing researchers to identify an ion channel related to the transient receptor potential (TRP) family from rat dorsal root ganglion (DRG) cells. The transient potential receptors or TRPs are involved in processes of sensory transduction in practically all multicellular organisms, being the TRPV1 ion channel the first member of this family to be associated to pain generation processes. Modulation of the channel's activity by antagonists and insensitivity by high potency agonists has shown to be an effective strategy for pain alleviation, but hasn't been fruitful due to the adverse effects seen in the treated individuals. This opens the necessity of identifying new molecules that could be leads for the development of more efficient and safer analgesic therapies through rational search strategies. In this way, using the tridimensional structures of the TRPV1 ion channel publicly available, this study aims to take advantage of the available computing capacity to adventure ourselves in the development of a computational strategy supported by an experimental validation for the identification of new activators of the TRPV1 ion channel to contribute with new leader compounds, more powerful than capsaicin, as starting points for generating new analgesic therapies. In addition, we hope to continue contributing to the understanding about the ligand dependent activation mechanism of the ion channel TRPV1 through the characterization of the molecular determinants that mediate the interaction of agonist ligands with the ion channel.

## **2. Introducción:**

### **2.1. Terminales sensoriales primarios:**

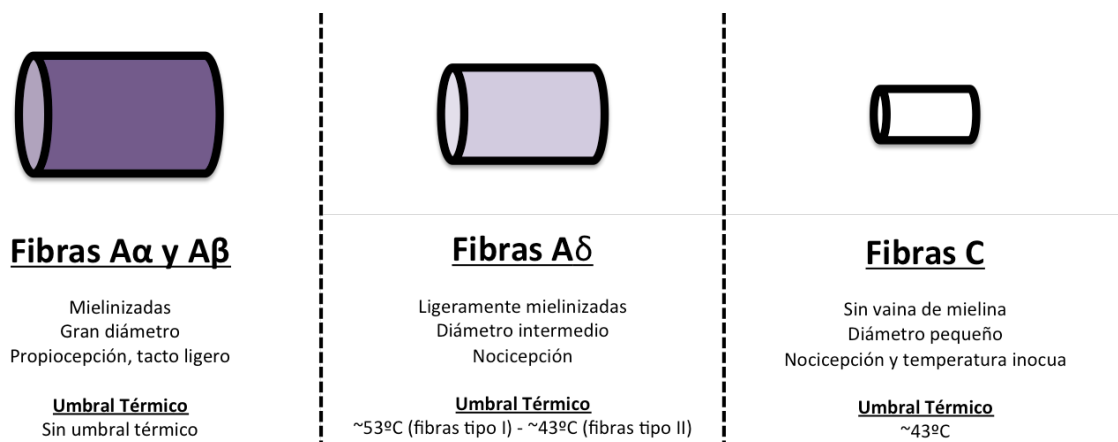
La supervivencia de un organismo esta directamente relacionada con su capacidad de percibir e interpretar de manera adecuada su entorno. Esta tarea es realizada por el sistema nervioso, el que interpreta una gran cantidad de estímulos ambientales potencialmente nocivos mediante la activación de un subgrupo de neuronas sensoriales llamados nociceptores (Basbaum and Jessell, 2000; Basbaum *et al.*, 2009; Levy, *et al.*, 2006). El proceso sensorial comprende diversas etapas de manera secuencial, iniciándose con la transmisión de la información para su procesamiento en el cerebro y finalizando con la ejecución de una respuesta motora; interviniendo, además, procesos de generación de memoria y aprendizaje (Basbaum y Jessell, 2000; Basbaum *et al.*, 2010; Levy, *et al.*, 2006). Los acontecimientos ambientales que pueden desencadenar una transducción sensitiva pueden ser mecánicos, térmicos, químicos o eléctricos, entre otros, y el tipo de transducción sensorial depende del aparato transductor estimulado (Levy, *et al.*, 2006). Cuando un estímulo de naturaleza química, mecánica o térmica supera un umbral de intensidad definido, se activan terminales sensoriales primarios específicos y se genera una respuesta dolorosa aguda, proceso conocido como nocicepción. Esta respuesta se define como una experiencia compleja, la que no solo comprende la activación de las vías de señalización molecular y de transmisión de un impulso nervioso, si no que a su vez involucra el trasfondo cognitivo y emocional del individuo (Julius y Basbaum, 2001). La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor lo define como “una experiencia sensorial y emocional no placentera asociada con daño tisular efectivo o potencial, o descrito en términos de ese daño” (IASP; <http://www.iasp-pain.org>). De este modo, los procesos sensoriales funcionan como un sistema de alerta para situaciones que potencialmente puedan generar lesiones, incentivando la ejecución de acciones motoras preventivas frente a ellas y, a su vez, nos permite generar un recuerdo para evitar situaciones similares en futuras ocasiones (Basbaum, *et al.*, 2009; Levy, *et al.*, 2006).

La existencia de los nociceptores fue propuesta a principios del siglo pasado, en 1906, por

Charles Sherrington en la recopilación de sus conferencias dictadas en Yale, las que tituló '*The integrative action of the nervous system*' (Burke, 2007; Levine, 2007). De acuerdo al modelo propuesto por Sherrington, los nociceptores son activados por estímulos capaces de generar daño tisular y poseen umbrales de activación característicos y diferenciados de otras fibras sensoriales (Burke, 2007; Julius y Basbaum, 2001; Levine, 2007). Mediante ensayos electrofisiológicos, se ha demostrado la existencia de terminales nerviosos primarios que pueden ser activados por temperaturas nocivas, químicos irritantes o presión intensa, pero no por temperaturas agradables o tacto ligero (Burgues y Perl, 1967).

Estos receptores han sido clasificados principalmente en dos grupos, basándose en criterios anatómicos y funcionales. El primer grupo comprende a fibras de tipo A $\delta$ , las cuales consisten en terminales mielinizados de diámetro intermedio y están relacionadas con la generación del “primer dolor” o dolor rápido (Basbaum, *et al.*, 2009). Más aún, las fibras de tipo A $\delta$  han sido subdivididas en dos grupos. Las fibras A $\delta$  de tipo I poseen gran sensibilidad a estímulos mecánicos y pueden ser activadas por estímulos térmicos por sobre los 50°C. Por otro lado, las fibras A $\delta$  de tipo II poseen una mayor sensibilidad a estímulos térmicos (>40°C) y una reducida sensibilidad a estímulos mecánicos (Basbaum, *et al.*, 2009; Burgues y Perl, 1967). El segundo grupo de nociceptores comprende fibras de tipo C de tamaño pequeño y sin vaina de mielina, las cuales corresponden a fibras polimodales con sensibilidad a estímulos nocivos de tipo mecánico y térmico. Estas mediarían la generación del “segundo dolor” o dolor lento, el cual es percibido como pobremente localizado (Basbaum, *et al.*, 2009). Este tipo de fibras también son sensibles a estímulos químicos, como pH ácido o capsaicina, el compuesto que produce la sensación de ardor al consumir frutos del género *Capsicum* como el ají (Burgues y Perl, 1967). En la clasificación general de terminales sensoriales primarios se incluye además a fibras de tipo A $\alpha$  y A $\beta$ , las cuales corresponden a axones de gran diámetro, mielinizadas y de rápida conducción (Julius y Basbaum, 2001). Estas no son consideradas nociceptores ya que responden principalmente a estímulos mecánicos inocuos como toques ligeros aplicados a la piel o músculos y no poseen umbrales de activación térmica (Djouhri, *et al.*, 1998). Generalmente se piensa en los nociceptores como mensajeros unidireccionales, los que transmiten los estímulos nocivos desde la periferia hasta la espina dorsal. Sin embargo, las fibras aferentes primarias poseen una

morfología única, llamada pseudounipolar, donde tanto los terminales centrales y periféricos emanan de un solo tallo neuronal (Levy, *et al.*, 2006). Los somas neuronales de los terminales sensoriales primarios se encuentran en los ganglios de la raíz dorsal (DRG) para aquellas fibras nociceptoras que inervan el cuerpo y en el ganglio trigeminal para aquellas fibras que inervan el rostro (Basbaum y Jessell, 2000, Basbaum, *et al.*, 2009; Meyer, *et al.*, 2008). A diferencia de lo que ocurre en la neurona prototípica, cuya rama receptora (dendrita) es distinta a la rama transmisora (axón), las proteínas sintetizadas en las neuronas del DRG y el ganglio trigeminal se distribuyen uniformemente desde las ramas neuronales centrales a las periféricas. Esto se traduce en neuronas bioquímicamente homogéneas que implica que los terminales nociceptores pueden enviar y recibir mensajes desde cualquiera de los dos extremos (Basbaum, *et al.* 2009). De este modo, la sutileza involucrada en la transducción de señales mediante la generación de un potencial de acción y la diferencia en la variedad de estímulos ambientales codificados por las distintas fibras sensoriales debe depender, principalmente, de la batería de receptores con los que cuenten los terminales sensoriales primarios (Levy, *et al.*, 2006; Waxman y Zamponi, 2014).



**Figura 1.** Tipos de aferentes sensoriales primarios. Figura esquemática representando los distintos tipos de axones aferentes primarios. Se muestran sus principales propiedades anatómicas y funcionales (modificada desde Julius y Basbaum, 2001).

## 2.2. Desde el potencial de acción a los canales iónicos:

Nuestro entendimiento más básico sobre los eventos moleculares que ocurren en la transmisión de un impulso nervioso se la debemos a una serie de trabajos publicados por Hodgkin y Huxley a mediados del siglo XX (Vandenberg y Waxman, 2012). Estos trabajos culminan con el desarrollo de un modelo matemático que da cuenta de la activación y dependencia de voltaje de las corrientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  durante el potencial de acción en el axón de calamar gigante (*Loligo*). Sin embargo, debieron pasar varios años para determinar la entidad responsable de los cambios en la permeabilidad de la membrana durante el potencial de acción. La primera evidencia experimental sobre la naturaleza proteica de las vías de paso para los iones viene del trabajo de Rojas y Luxoro en 1963. Ellos mostraron que la inactivación característica de las corrientes de sodio en el axon de *Loligo* desaparecía luego de la aplicación intracelular de la proteasa tripsina (Rojas y Luxoro, 1963). Posteriormente, tomando ventaja de la fisiología de la anguila eléctrica (*Electrophorus electricus*), se logró purificar el componente responsable de la sensibilidad a tetrodotoxina (TTX). Este corresponde a una proteína de 230 kDa, cuya interacción con la toxina bloqueaba la conducción del impulso eléctrico mediante la inhibición de las corrientes de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje, soportando la naturaleza proteica de las vías de paso de los iones a través de la membrana (Agnew, *et al.*, 1978).

De la mano de los avances en biología molecular llegó la posibilidad de realizar el clonamiento de secuencias para la expresión y caracterización de las moléculas responsables de las conductancias iónicas, siendo la primera secuencia identificada la correspondiente al receptor ACh (Noda, *et al.*, 1983). En el año 2003, el grupo de Roderick Mackinnon entregó el primer dato cristalográfico para un canal iónico, correspondiente a un canal de potasio dependiente de voltaje de *Aeropyrum pernix* (Jiang, *et al.*, 2002). Este mostraba una estructura de tipo cuaternaria en donde cuatro monómeros del canal compuestos de 6 segmentos transmembrana se organizaban en torno a una región central formando un poro (Jiang, *et al.*, 2002). Desde ese punto, la secuenciación de los genomas de diversas especies, el clonamiento de secuencias y su posterior análisis estructural y funcional, revelaron la existencia de diversos tipos de canales, dando origen a múltiples familias y superfamilias (Choe, 2002). Para tener una perspectiva con

mayor detalle, se refiere a visitar la base de datos The Transport Clasification Database (TCDB) de la Universidad de California ([www.tcdb.org](http://www.tcdb.org); Saier, *et al.*, 2014). En las vías nociceptivas se han logrado identificar al menos tres isoformas de canales de sodio dependientes de voltaje ( $\text{Na}_v$ ), los cuales serían centrales en la generación del potencial de acción asociados a la transmisión de un impulso doloroso (Waxman y Zamponi, 2014). Más aún, se le ha atribuido un rol protagónico en la regulación de la excitabilidad neuronal en las vías nociceptivas a al menos 8 isoformas de canales de potasio dependientes de voltaje ( $\text{K}_v$ ), un canal de potasio dependiente de calcio ( $\text{Bk}$ ), a canales de calcio dependientes de voltaje ( $\text{Ca}_v$ ) y diversos canales no selectivos pertenecientes a la superfamilia denominada receptores de potencial transiente (Transient Receptor Potential, TRP) (Basbaum, *et al.*, 2009; Bourinet, *et al.*, 2014; Waxman y Zamponi, 2014).

### 2.3. La familia de canales de potencial transiente ‘TRP’:

Los receptores de potencial transiente o TRP se encuentran involucrados en procesos de transducción sensorial de prácticamente todos los organismos multicelulares, como en la visión, audición, tacto, olfato, gusto, percepción de temperatura y en la sensación de dolor (Latorre, *et al.*, 2007a). Estos canales se identificaron por primera vez gracias a una mutación presente en el genoma de la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, donde el fenotipo resultante poseía deficiencias en el proceso de fototransducción del ojo. Esto generaba una respuesta despolarizante transitoria frente a un estímulo luminoso, induciendo ceguera temporal, y la cual era recuperada en regímenes de oscuridad (Cosens y Manning, 1969). En la familia de canales TRP de mamíferos, se han agrupado actualmente cerca de 30 individuos, y de acuerdo a su similitud de secuencia se han dividido en 7 subfamilias: TRPC (canónicos), TRPV (vaniloides), TRPM (melastatina), TRPA (ankirina), TRPN (no mecanorreceptor), TRPP (policistina) y TRPL (mucolipina) (Arias-Darraz, *et al.*, 2015; Diaz-Franulic, *et al.*, 2016; Gomtsyan y Connie, 2010). Los canales TRP son receptores polimodales, pudiendo ser activados por múltiples estímulos como temperaturas frías o calientes (dependiendo del subtipo), por voltaje y ligandos (Baez-Nieto, *et al.*, 2011; Latorre, *et al.*, 2007a; Latorre, *et al.*, 2007b; Latorre, *et al.*, 2009). En

este contexto, 9 miembros responden a umbrales térmicos de distinta magnitud, donde TRPV1-4, TRPM2, TRPM4 y TRPM5 son canales que responden a calor, mientras que TRPA1 y TRPM8 son activados por frío (Latorre, *et al.*, 2007a). Miembros del grupo de canales TRP sensibles a la temperatura (termo TRP's) han sido asociados con la generación del dolor por la exposición a temperaturas nocivas o a compuestos como capsaicina, mentol o el aceite de mostaza (Gomtsyan y Faltynek, 2010). Actualmente existe creciente evidencia de que estos canales son regulados por mediadores inflamatorios como serotonina y prostaglandinas, evidenciando la relevancia de su sensibilización en la vía de generación del dolor. De este modo, la desregulación de la expresión o de su función ha sido generalmente relacionada con el dolor neurogénico e inflamación, siendo el canal TRPV1 el primer miembro de esta familia en ser asociado a procesos nociceptivos (Bourinet, *et al.*, 2014; Caterina, *et al.*, 1997; Cortright, *et al.*, 2007; Gomtsyan y Faltynek, 2010).

#### 2.4. Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1):

El canal TRPV1 fue clonado por primera vez a partir de células del DRG de rata (Caterina, *et al.*, 1997). Durante décadas, el uso de capsaicina, compuesto picante del ají, como agente farmacológico específico para la caracterización funcional de terminales sensoriales primarios fue amplia (LaMotte *et al.* 1988; Petersen y LaMotte, 1993; Szolcsanyi, *et al.*, 1986; Szolcsanyi, 1987; Szolcsanyi, *et al.*, 1988). Es conocido que la inyección intradermal de capsaicina en humanos produce una sensación de ardor e hiperalgesia cutánea (LaMotte, *et al.* 1988), además, la aplicación *in vivo* en modelos animales demostró la capacidad de estimular un tipo de aferentes primarios (Szolcsanyi, *et al.*, 1986; Szolcsanyi, 1987; Szolcsanyi, *et al.*, 1988). Si bien estas evidencias sugerían la existencia de un receptor para este compuesto, no fue hasta 1997 donde fuera identificado por el grupo de David Julius utilizando una estrategia de *screening* funcional de una librería de cDNA generada a partir de células del DRG de rata (Caterina, *et al.*, 1997). La identificación de un clon que otorgaba sensibilidad a capsaicina a células no neuronales, reflejada en un aumento a la permeabilidad de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia del agonista, confirmó la existencia de este receptor y el análisis comparativo de su secuencia mostró similitud con un grupo de canales de la familia TRP, el cual era representado por miembros de *Homo*



*sapiens*, *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* (Caterina, *et al.*, 1997).

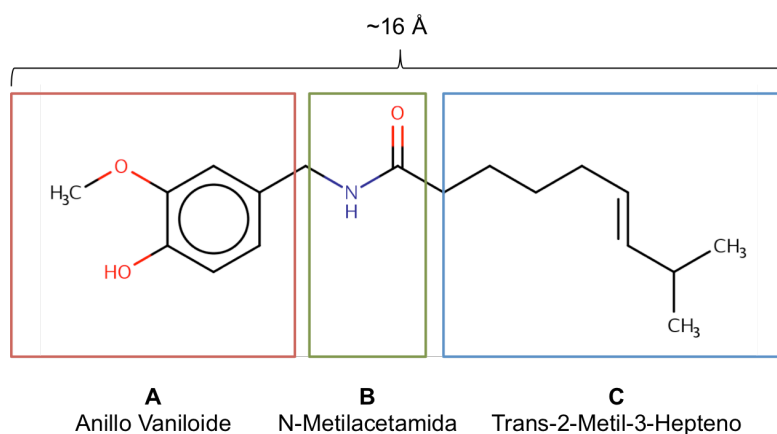
Este canal, llamado inicialmente VR1 (Vanilloid Receptor 1) por ser el receptor de compuestos vaniloides como la capsaicina, abrió nuevas rutas para el entendimiento de los procesos asociados a la generación de dolor e inflamación y de manera consecuente, su caracterización ha sido la temática de múltiples trabajos de investigación (Caterina, *et al.*, 1997; Boukalova, *et al.*, 2010; Cao, *et al.*, 2013; Chou, *et al et al.*, 2004; Gavva, *et al.*, 2004a; Darré y Domene, 2015; Díaz-Franulic, 2016; Hanson, *etal.*, 2015; Jordt y Julius, 2002; Kym., *et al.*, 2009; Liao, *et al.*, 2013; Poblete, *et al.*, 2015; Susankova, *et al.*, 2007; Tominaga, *et al.*, 1998; Winter, *et al.*, 2013). La caracterización funcional de VR1 mostró que su respuesta a capsaicina era dosis dependiente y que posee una permeabilidad relativa mayor para cationes divalentes por sobre monovalentes, siendo calcio el que posee la mayor permeabilidad ( $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Na}^{+}$ ) (Caterina, *et al.*, 1997, Tominaga, *et al.*, 1998). Se determinó, además, que el canal posee otras modalidades de activación, presentando un umbral de activación térmica cercano a los 42°C y una sensibilidad intrínseca a la acidificación del medio, lo que guarda relación con el comportamiento de las neuronas del DRG (Caterina, *et al.*, 1997, Petersen y LaMotte, 1993, Tominaga, *et al.*, 1998).

Mediante el estudio de las múltiples modalidades de respuesta de las neuronas del DRG, se demostró que el incremento en la concentración de protones externa en el tejido neuronal, es capaz de potenciar las corrientes evocadas por capsaicina (Petersen y LaMotte, 1993). Este comportamiento se ve reflejado en la actividad del canal TRPV1, donde se determinó que la magnitud de las corrientes de entrada, generadas por la activación dependiente de un primer estímulo como capsaicina, aumentaba en presencia de un segundo estímulo como temperatura, sugiriendo que ambos estímulos estaban acoplados en la vía de activación del canal (Caterina, *etal.*, 1997, Tominaga, *et al.*, 1998). Así, actualmente la activación del canal TRPV1 es explicada por el modelo alostérico, es decir, se considera que cada estímulo que es capaz de activar el canal posee su sensor propio, distinto a la compuerta de activación, los cuales se comunicarían a larga distancia con la región del poro, gatillando la apertura del canal (Diaz-Franulic, *et al.*, 2016; Gregorio-Teruel, *et al.*, 2015; Latorre, *et al.*, 2007b). De este modo, es lógico pensar que en una estructura con diversos sensores estos estén comunicados entre si, por lo cual se pueden definir constantes alostéricas, cuyo valor depende de la cantidad de sensores activados. Este modelo se

traduce en la modificación del equilibrio del canal entre los estados cerrado y abierto, lo que puede ser validada experimentalmente como la probabilidad de apertura del canal ( $P_o$ ) (Diaz-Franulic, *et al.*, 2016; Gregorio-Teruel, *et al.*, 2015; Latorre, *et al.*, 2007).

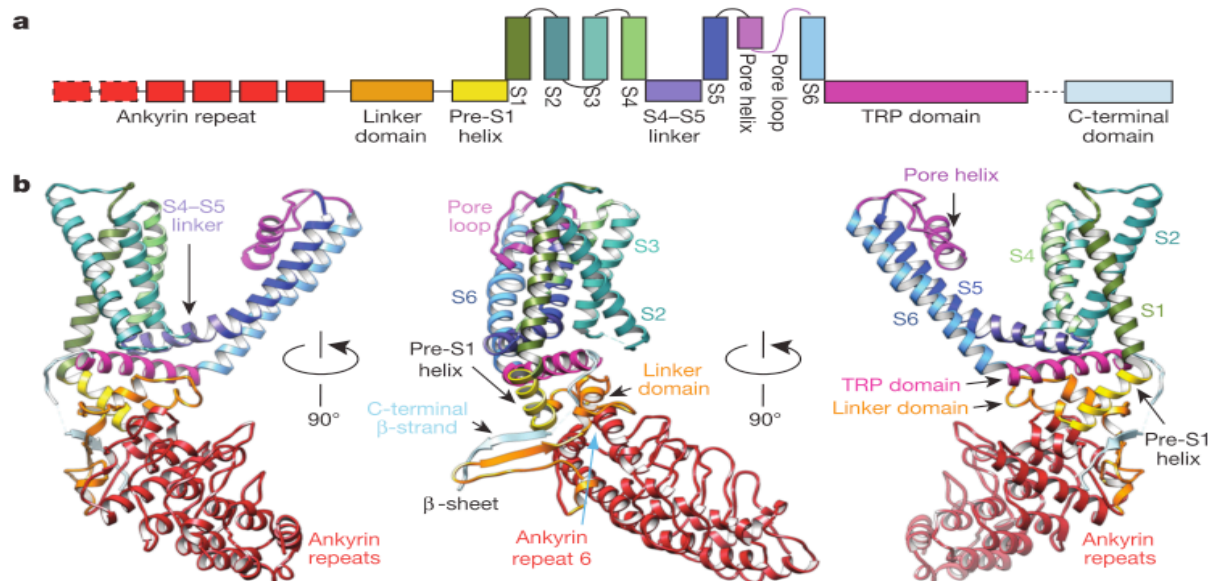
Es sabido que el canal puede responder a una gran diversidad de ligandos exógenos como la piperina (pimienta) o el alcanfor (alcanforero), además de compuestos endógenos como PI(4,5)P<sub>2</sub> o anandamida (Brauchi, *et al.*, 2007; Brito, *et al.*, 2014; Chou, *et al.*, 2004; Holzer, 2008; Palazzo, *et al.*, 2008; Peppin y Pappagallo, 2014; Poblete, *et al.*, 2015; Steinberg, *et al.*, 2014; Toh, *et al.*, 1954), lo que sugiere un sitio de unión a agonistas promiscuo o múltiples sitios de unión. La información acumulada que se generó a partir de estudios de mutagénesis en el canal TRPV1 y la sistematización de esta, logró entregar un panorama general sobre los determinantes de la sensibilidad a estos compuestos (Winter, *et al.*, 2013). De este modo, se identificaron residuos específicos que determinan la sensibilidad para distintos grupos de agonistas, los que se encuentran alejados entre ellos en la secuencia lineal del canal, pero al no conocer la topología del plegamiento de la proteína, esta evidencia por si sola no es concluyente. Sin embargo, la gran diversidad estructural entre los agonistas conocidos del canal (Gomtsyan y Faltynek, 2010), aportan a la idea de múltiples sitios de unión a ligandos, siendo el posible sitio de unión a compuestos de tipo vaniloide (como la capsaicina) el que generó un mayor interés en ser identificado (Boukalova, *et al.*, 2010; Cao, *et al.*, 2013; Chou, *et al.*, 2004; Gavva, *et al.*, 2004a; Jordt y Julius, 2002; Kym., *et al.*, 2009; Liao, *et al.*, 2013; Susankova, *et al.*, 2007, Winter, *et al.*, 2013).

Los compuestos de tipo vaniloide, llamados de este modo por el anillo característico (Figura 2), poseen características estructurales definidas (Walpole, *et al.*, 1996). Para interactuar con TRPV1, los sustituyentes presentes en el anillo vaniloide son necesarios para su potencia (región A), al igual que la ramificación de trans-2-metil-3-hepteno, mientras que el grupo N-metilacetamida sería relevante para su variabilidad conformacional (Figura 2) (Walpole, *et al.*, 1996).



**Figura 2.** Características estructurales de capsaicina. En la figura se muestran los segmentos relevantes para la funcionalidad de capsaicina (ZINC ID:1530575), identificados mediante modificación química de la molécula (Walpole, *et al.*, 1996). La región A corresponde al anillo vaniloide, región que le da el nombre a este tipo de compuestos. Esta región se encuentra íntegramente presente en otros compuestos agonistas de TRPV1 como la Resiniferatoxina (RTx) (Szallasi y Blumberg, 1989) y de manera parcial en antagonistas como la capsacepina (CPZ) (Bovermann, *et al.*, 1994).

Para la identificación de un posible sitio de unión a compuestos de tipo vaniloide, se aprovecharon las diferencias entre especies en la sensibilidad a este tipo de agonistas (Gavva, *et al.*, 2004a; Szolcsanyi, *et al.*, 1986; Szolcsanyi, 1987; Szolcsanyi, *et al.*, 1988). A diferencia de las ratas o humanos, las aves son insensibles a capsaicina (Szolcsanyi, *et al.*, 1986). De este modo, a través de la generación de canales quiméricos y reemplazando residuos localizados en los segmentos transmembranales S2 y S3 del canal de rata, por los correspondiente a su ortólogo de aves, fue posible eliminar la sensibilidad a capsaicina, sin modificar las respuestas iniciadas por pH o temperatura (Gavva *et al.* 2004). Además, determinaron que los residuos MET547 y THR550 del canal TRPV1 de rata, localizados en los segmentos transmembranales S3 y S4, confieren sensibilidad a capsaicina al canal TRPV1 de conejo, que bajo condiciones naturales es insensible a este compuesto (Gavva *et al.* 2004). Muchos otros trabajos buscaron revelar otros residuos que tuvieran directa incidencia en la sensibilidad a agonistas de tipo vaniloide, sugiriendo que los residuos TYR511, SER512, VAL667 y LEU669 serían claves para la



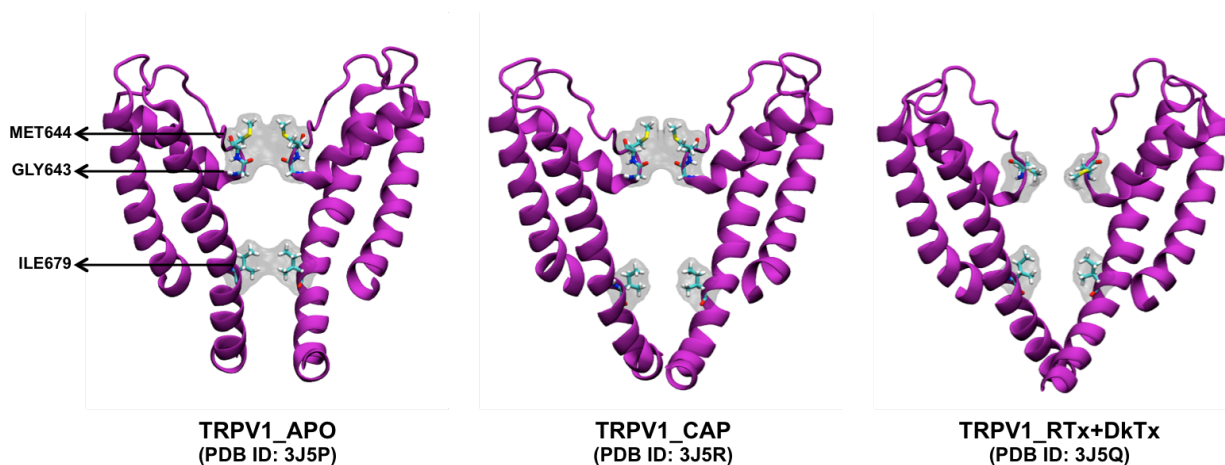
**Figura 3.** Detalles estructurales de TRPV1 obtenidos mediante criomicroscopía electrónica (extraída de Liao, *et al.*, 2013) **a.** Representación lineal del canal en donde se muestran los principales dominios presentes en su estructura. Las líneas punteadas representan dominios que no pudieron ser resueltos correctamente. **b.** Diagrama de listones representando la estructura de un monómero de TRPV1 y coloreado según el diagrama superior.

sensibilidad a este tipo de compuestos. De estos, el residuo TYR511 sería el más relevante, ya que al ser mutado por alanina, el canal se vuelve completamente insensible a capsaicina (Boukalova, *et al.*, 2010; Cao, *et al.*, 2013; Chou, *et al.*, 2004; Gavva, *et al.*, 2004; Jordt y Julius, 2002; Kym., *et al.*, 2009; Liao, *et al.*, 2013; Susankova, *et al.*, 2007, Winter, *et al.*, 2013). Luego de casi dos décadas desde el clonamiento del canal TRPV1, la estructura tridimensional logró ser resuelta mediante criomicroscopía electrónica o cryo-EM (van Heel, *et al.*, 2000), la cual permite obtener imágenes de moléculas capturadas en solvente en fase sólida a bajas temperaturas y a partir de ellas reconstruir la estructura de baja resolución de la proteína de interés (Milne, *et al.*, 2013; Cao, *et al.*, 2013; Liao, *et al.*, 2013; van Heel, *et al.*, 2000). A partir de esto datos se logró determinar que, de manera similar al canales de potasio dependientes de voltaje resuelto por el grupo de MacKinnon 2003, este canal posee en cada subunidad 6 segmentos transmembranales (enumerados como S1 a S6). Así mismo, la estructura cuaternaria de un canal funcional está organizada en disposición tetramérica, ensamblada alrededor de la intersección de las cadenas S5

y S6 de cada subunidad, formando un poro acuoso en la región central (Cao, *et al.*, 2013; Liao, *et al.*, 2013). El canal TRPV1 consta de un filtro de selectividad formado por el *loop* del poro, localizado entre los segmentos transmembranales S5 y S6, el cual le otorgaría la preferencia por conducir calcio por sobre otros cationes (Caterina, *et al.*, 1997). Cuenta además de un dominio TRP, motivo de 25 aminoácidos conservado en la mayoría de canales de potencial transiente con el motivo característico 'EWKFAR' (Clapham, *et al.*, 2002). Este dominio estaría relacionado con el acoplamiento entre los diversos estímulos y serviría como dominio de asociación para el evento de tetramerización del canal. Así, su disposición paralela a la membrana y su interacción con distintas regiones intracelulares del canal, sugieren que el dominio completo sería relevante para la activación de TRPV1 (Gregorio-Teruel, *et al.*, 2015).

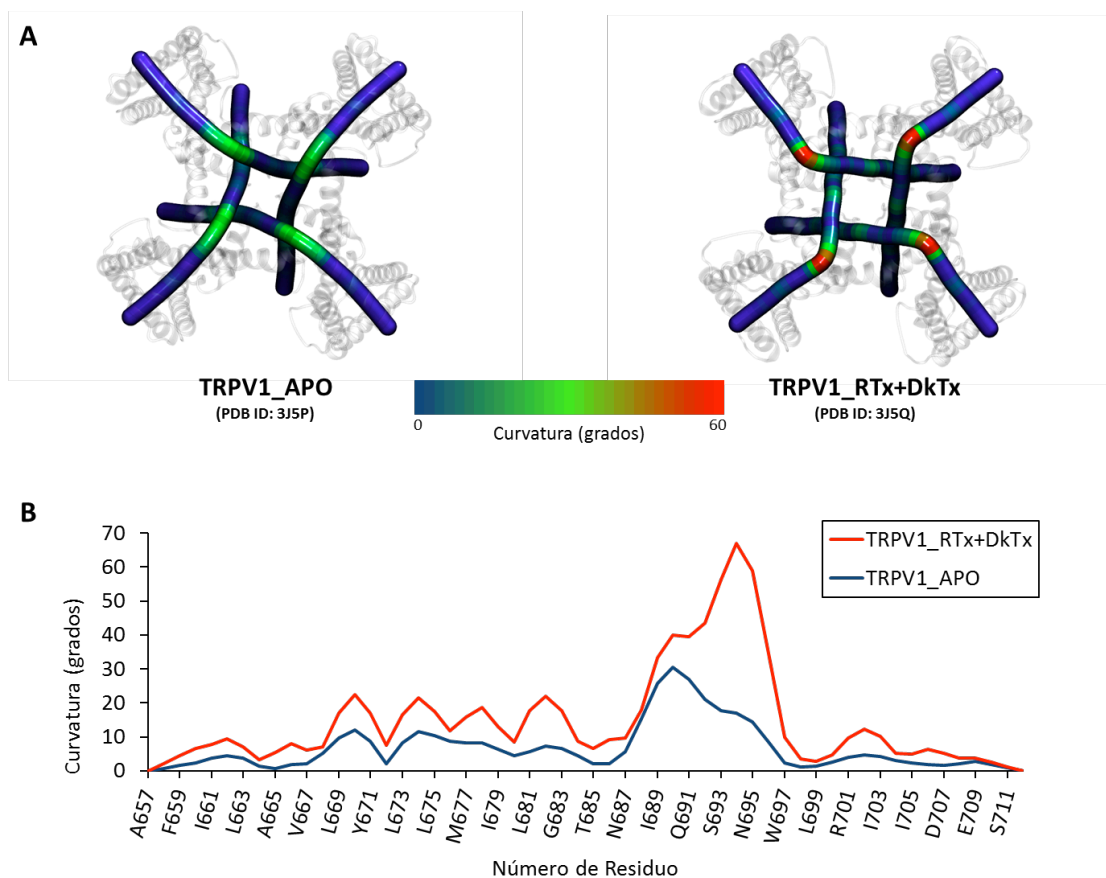
El canal de rata fue resuelto en tres conformaciones. Se presentó en un estado en ausencia de agonistas, la que comprendería una conformación completamente cerrada (PDB ID: 3J5P), en presencia de capsaicina (PDB ID: 3J5R) y en presencia de la toxina de araña de doble nudo DkTX y resiniferatoxina (RTx), un compuesto de tipo vaniloide que es un análogo ultrapotente de capsaicina (PDB ID: 3J5Q) (Liao, *et al.*, 2013). Gracias a esto, valiosa información estructural pudo ser obtenida con respecto a la localización del sitio de unión a compuestos vaniloides (Figura 4), observándose densidades electrónicas en la vecindad de las cadenas S3 y S4 atribuibles a los ligandos co-resueltos con el canal (Cao, *et al.*, 2013). De este modo la información obtenida mediante mutagénesis pudo ser validada en cierto grado, pero debido a la baja resolución obtenida, los modos de unión de los ligandos no pueden ser observados. Por otro lado, el estudio del radio del poro en las estructuras tridimensionales del canal, reveló que el este cuenta con un sistema de dos compuertas. La primera de ellas está formada por los residuos GLY643 y MET644, en el filtro de selectividad y correspondería a la compuerta superior. La segunda compuerta está formada por el residuo ILE679, cuya interacción da origen a un sello de tipo hidrofóbico correspondiente a la compuerta inferior. El estudio revela además que los compuestos de tipo vaniloide estarían relacionados con la apertura de la compuerta inferior del canal, mientras que la toxina de doble nudo sería la responsable de la apertura de su contraparte superior (Figura 5).





**Figura 5.** Compuertas del canal TRPV1. Se muestran las compuertas superior e inferior del canal TRPV1 según lo descrito en la literatura (Cao, *et al.*, 2013; Liao, *et al.*, 2013), para las estructuras resueltas en ausencia de agonistas (TRPV1\_APO), en presencia de capsaicina (TRPV1\_CAP) y en presencia de resiniferatoxina y la toxina de doble nudo (TRPV1\_RTxDkTx).

A pesar de que la fisiología de TRPV1 ha sido caracterizada en detalle y la estructura tridimensional está actualmente disponible, los eventos estructurales que median la activación del canal en sus distintas modalidades siguen siendo un misterio (Cao, *et al.*, 2013, Chou, *et al.*, 2004, Diaz-Franulic, *et al.*, 2016; Hanson, *et al.*, 2015, Kym, *et al.*, 2009, Latorre, *et al.*, 2007b; Liao, *et al.*, 2013). Con el fin de identificar eventos relevantes en la apertura dependiente de ligando, se puede comparar las estructuras de TRPV1 en complejo con capsaicina (PDB ID: 3J5R) con la estructura del canal cerrado (PDB ID: 3J5P) (Cao, *et al.*, 2013, Liao, *et al.*, 2013). En ellas, se evidencia una modificación en el ángulo de curvatura de la intersección entre el segmento transmembranal S6 y el dominio TRP entre ambos estados, lo que puede ser atribuible a la acción del agonista (Figura 6). Esto fue demostrado recientemente por nuestro grupo de investigación mediante simulaciones moleculares de TRPV1 en complejo con capsaicina y PI(4,5)P2 (Poblete, *et al.*, 2015), corroborando la importancia de los residuos descritos para la unión de capsaicina y dando luces sobre lo que puede corresponder primeros pasos de la activación de TRPV1 dependiente de ligando.



**Figura 6.** Correlación estructura-función de ligando y el segmento S6-TRP. **A.** Se muestra la comparación en la curvatura del segmento S6-TRP entre las estructuras del canal TRPV1 resueltas por criomicroscopía electrónica de partícula única, en ausencia de ligandos (izquierda) y en presencia de resiniferatoxina y la toxina de doble nudo (derecha) (Cao, *et al.*, 2013, Liao, *et al.*, 2013). Según lo descrito en la literatura, capsaicina y resiniferatoxina abrirían la compuerta inferior del canal (Cao, *et al.*, 2013, Liao, *et al.*, 2013) y esto se traduciría en aumento en la curvatura del segmento S6-TRP (Poblete, *et al.*, 2015). **B.** El gráfico de la curvatura de ambos segmentos muestra que la mayor curvatura se produce a la altura del residuo ARG694, como se describe en la literatura (Poblete, *et al.*, 2015).

## 2.5. TRPV1 como blanco farmacológico relevante en el tratamiento del dolor:

Como se mencionó anteriormente, el canal TRPV1 fue el primer miembro de esta familia en ser asociado a procesos de generación de dolor debido a su localización histológica y su caracterización fisiológica (Caterina, *et al.*, 1997; Szallasi y Blumberg, 1996). Más aún, el rol de



el canal TRPV1 como componente clave en las vías nociceptivas fue reforzado al demostrarse que en ratones donde el gen que codifica para TRPV1 fue eliminado por manipulación genética (TRPV1<sup>-/-</sup>), no se presenta la hiperalgesia térmica que se produce asociada a procesos inflamatorios (Caterina, *et al.*, 2000; Mitchell, *et al.*, 2014). En este contexto, actualmente es conocido que tanto la sensibilización del canal por metabolitos endógenos como el aumento de la expresión del canal ocurre durante la iniciación de procesos inflamatorios y en presencia de lesiones (Immke y Gavva, 2006; Simonic-Kocijan, *et al.*, 2013; Spicarova, *et al.*, 2014; Wong y Gavva, 2009). Así, la sensibilización del canal puede ocurrir por diversos mecanismos moleculares, como la fosforilación en la región intracelular por la proteína kinasa A (PKA) o la interacción con metabolitos proinflamatorios como protones (Brederson, 2013; Caterina, *et al.*, 2000; Wong y Gavva, 2009), pudiendo estos estímulos actuar de manera independiente o de manera cooperativa para la potenciación de la respuesta (Di Marzo, *et al.*, 2002; Malek, *et al.*, 2015). Así, el canal TRPV1 no solo correspondería a un ente señalizador en la vía del dolor, si no que mas bien corresponde a un integrador de múltiples estímulos potencialmente nocivos en esta vía. (Baez-Nieto, *et al.*, 2011; Basbaum *et al.*, 2010; Diaz-Franulic, *et al.*, 2016; Szallasi, *et al.*, 2006).

Al canal TRPV1 se le relaciona con múltiples condiciones como diabetes, obesidad o problemas en el control de la vejiga (Brito, *et al.*, 2014; Caterina, *et al.*, 1997; Kym, *et al.*, 2009; Nilius, *et al.*, 2007; Peppin y Pappagallo, 2014; Szallasi, *et al.*, 2006). Existe una correlación entre aumento de la expresión de este canal y la aparición de condiciones patológicas en las vías aéreas, como la alta incidencia de tos en pacientes no asmáticos, así como de enfisema en pacientes fumadores (Brito, *et al.*, 2014; Caterina, *et al.*, 1997; Kym, *et al.*, 2009; Nilius, *et al.*, 2007; Peppin y Pappagallo, 2014; Szallasi, *et al.*, 2006). Más aún, el canal TRPV1 ha mostrado ser clave en la generación de dolor tanto agudo como crónico en múltiples patologías como en la presencia de caries, síndrome de colon irritable, cistitis, fracturas óseas, osteoartritis y en algunos tipos de cáncer (Adcock, 2009; Brito, *et al.*, 2014; Caterina, *et al.*, 1997; Kym, *et al.*, 2009; Nilius, *et al.*, 2007; Peppin y Pappagallo, 2014; Szallasi, *et al.*, 2006; Wong y Gavva, 2009). En este contexto, cuando el dolor supera su barrera temporal de utilidad, puede volverse constante y debilitante, ocurriendo la transición del dolor agudo a crónico (Crombie, *et al.*, 1998; Davies, *et*

*al.*, 1998; Pozek, *et al.*, 2016). La causalidad de la ocurrencia de esta transición no está del todo clara, atribuyéndose factores genéticos, fisiológicos, psicológicos y sociales, siendo un tópico de gran controversia desde los años 70' (Crombie, *et al.*, 1998). Las estrategias actuales para combatir el dolor no representan una medida eficaz, siendo moderado el beneficio (Brederson, *et al.*, 2013). La principal razón es el amplio rango de efectos secundarios asociados a las terapias existentes como mareos, náuseas, depresión respiratoria, adicción y tolerancia (Gavva, *et al.*, 2008; Moore, *et al.*, 2012). Esto plantea el requerimiento de la generación de nuevas aproximaciones no invasivas y específicas para este fin.

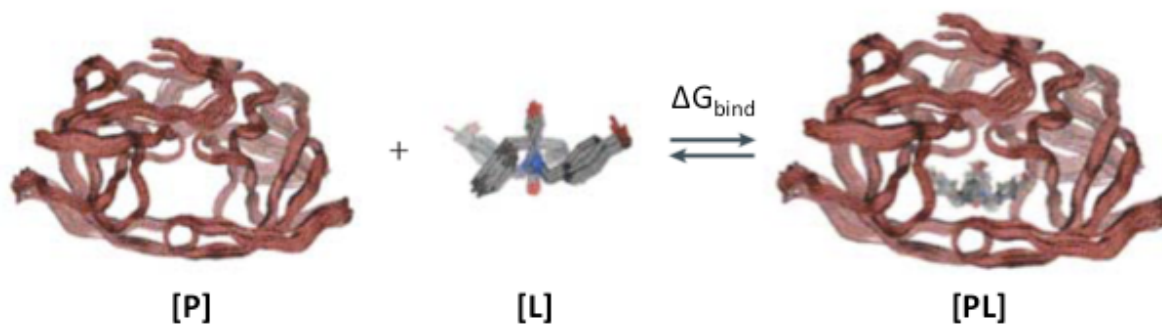
Muchos autores concuerdan en que el desarrollo de nuevos fármacos que modulen la actividad del canal TRPV1 presenta una oportunidad para la generación de nuevas terapias analgésicas (Baez-Nieto, *et al.*, 2011; Basbaum and Jessell, 2000; Basbaum *et al.*, 2010; Diaz-Franulic, *et al.*, 2016; Di Marzo, *et al.*, 2002; Gomtsyan y Faltynek, 2010; Julius y Basbaum, 2001; Malek, *et al.*, 2015; Morales-Lázaro, *et al.*, 2013; Szallasi, *et al.*, 2006; Walpole, *et al.*, 1996). Existen trabajos en donde se demuestra que la abolición de la actividad del canal en neuronas aferentes primarias, resulta en la disminución de la secreción de agentes proalgésicos que participan en la iniciación de la respuesta dolorosa aguda y en la generación del dolor neurogénico (Peppin y Pappagallo, 2014; Planells-Cases, 2005; Szallasi, *et al.*, 2006; Wong y Gavva, 2009). Además, se ha demostrado que la insensibilización del canal ha sido eficaz para revertir el dolor e inflamación generado en distintas especies como roedores (Cui, *et al.*, 2006; Gavva *et al.*, 2004b; Rami *et al.*, 2006; Szallasi y Blumberg, 1999) y humanos (Knotkova, *et al.*, 2008) además de tratar la condición de dolor agudo asociado a patologías degenerativas como osteoartritis (Cui, *et al.*, 2005) y cáncer (Ghilardi *et al.*, 2005). De este modo, se puede concluir que la modulación de la actividad del canal TRPV1 por vías farmacológicas presenta una nueva perspectiva para el desarrollo de terapias analgésicas novedosas.

## 2.6 Agonistas de TRPV1 como agentes analgésicos:

Existen registros históricos en que describen métodos para la utilización de extractos de ají y pimienta como terapias en contra del dolor y la inflamación (Peppin y Papagallo, 2014),

metodologías que perduran incluso en la actualidad pero con una modesta efectividad, debido a la baja permeabilidad de estos compuestos en la piel (Kim, *et al.*, 2014) y a la alta concentración de compuesto requerido para este propósito (Petersen y LaMotte, 1993). Como se mencionó anteriormente, la aplicación intradérmica de capsaicina produce una sensación de ardor, por esta razón es contradictorio pensar en la utilización de capsaicina con ese fin. Sin embargo, se demostró que las fibras aferentes primarias pueden ser desensibilizadas mediante la aplicación de una alta cantidad de capsaicina (Szolcsányi, 1989) o mediante aplicaciones consecutivas de este agonista (Petersen y LaMotte; 1993). Esta acción paradójica se conoce como taquifilaxis, efecto similar al de un antagonista selectivo (Bevan, *et al.*, 1992; Petersen y LaMotte, 1993).

Gracias a esta actividad paradójica y a la relevancia del canal TRPV1 como blanco terapéutico, hoy en día existe un renovado interés en desarrollar tratamientos analgésicos utilizando derivados de capsaicinoides y teniendo al canal TRPV1 como diana, existiendo una gran gama disponible actualmente en el mercado, siendo estos derivados de capsaicina y resiniferatoxina principalmente (Baez-Nieto, *et al.*, 2011; Basbaum and Jessell, 2000; Basbaum *et al.*, 2010; Brederson, *et al.*, 2013; Diaz-Franulic, *et al.*, 2016; Di Marzo, *et al.*, 2002; Gomtsyan y Faltynek, 2010; Julius y Basbaum; 2001; Malek, *et al.*, 2015; Szallasi, *et al.*, 2006; Walpole, *et al.*, 1996). De manera complementaria, existe una nutrida bibliografía y registros de patentes describiendo rutas de síntesis tanto de agonistas como antagonistas del canal (Andreev, *et al.*, 2013; Holzer y Izzo, 2014; Ivanova, *et al.*, 2014; Kang, *et al.*, 2010; Painter, *et al.*, 2014; Peppin y Pappagallo, 2014; Walpole, *et al.*, 1996; Wong y Gavva, 2009), además de describir sugerencias para la modificación química de estos análogos para mejorar su potencia (Ryu, *et al.*, 2014; Walpole, *et al.*, 1996; Wang, *et al.*, 2012). No obstante, es posible constatar que estas estrategias de búsqueda no han sido fructíferas, debido a que muchos de los compuestos que lograron entrar en fase clínica, casi en su totalidad presentó efectos adversos significativos como hipertermia severa en los individuos tratados, lo que no genera una adecuada relación beneficio-riesgo para los pacientes (Gavva, *et al.*, 2004b; Julius, 2013; Peppin y Pappagallo, 2014). Esto abre la necesidad de la identificación mediante estrategias de búsqueda racional de nuevas moléculas, las que puedan servir como pistas para el desarrollo de terapias analgésicas más eficaces y seguras.



**Figura 7.** Representación de una simulación de acoplamiento molecular (*docking*). La simulación de acoplamiento molecular permite identificar la mejor conformación de un ligando [L] en el sitio de unión de un receptor protéico [P] al formar el complejo proteína-ligando [PL]. La afinidad del ligando por el sitio del receptor es representada como un valor de energía libre de unión ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ).

El concepto de búsqueda racional permite el descubrir nuevas moléculas pequeñas con actividad por un blanco biológico, las que puedan ser utilizados como drogas en nuevas terapias de manera directa (Leeson y Springthorpe, 2007; Lipinski, *et al.*, 2001; Lipinski, 2004; Redl, *et al.*, 1974; Ursu, *et al.*, 2011) o pueden cimentar el camino para la síntesis de diversas moléculas de mejor rendimiento y con efectos secundarios reducidos (Lipinski, *et al.*, 2001; Lipinski, 2004; Redl, *et al.*, 1974). Típicamente el proceso de descubrimiento de nuevas drogas es de alto riesgo económico para las empresas farmacéuticas, tarda en promedio de 12 a 14 años y comprende una inversión de millones de dólares (Lombardino y Lowe III, 2013). La estrategia general consiste en la identificación de nuevos compuestos líderes (*leads*) a través de la determinación de actividad de librerías de miles de compuestos *in vitro* (Lombardino y Lowe III, 2013).

Gracias a los avances tecnológicos, los que resultan en computadores cada vez mas potentes y en el desarrollo de *software*, actualmente es posible realizar la búsquedas de nuevas drogas en librerías de miles de compuestos en unos cuantos días mediante estrategias racionales *in silico*, no solo reduciendo el tiempo necesario para la identificación de nuevos ligandos activos, si no que resultando en una disminución de costos significativa (Kitchen, *et al.*, 2004; Klebe, 2006; McInnes, 2007; Okimoto, *et al.*, 2009; Seeliger, *et al.*, 2010; Sousa, *et al.*, 2006). Con este fin, son ampliamente utilizados los *softwares* de acoplamiento molecular (*molecular docking*), los cuales permiten realizar la búsqueda conformacional en la interacción proteína-

ligando, basados en el paradigma de la llave-cerradura (Kitchen, *et al.*, 2004). Esta técnica computacional permite realizar la predicción del modo de unión de un ligando en el sitio de unión y a su vez, permite calcular la afinidad del ligando por el receptor expresado como un valor de energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) (Figura 7) (Kitchen, *et al.*, 2004). Estos programas de acoplamiento molecular poseen funciones de puntuación debidamente entrenadas y basadas en evidencia empírica para la identificación de la mejor pose, además de una función de energía libre que considera las contribuciones de interacciones no covalentes en la afinidad del ligando (Kitchen, *et al.*, 2004; Sousa, *et al.*, 2006; Trott y Olson, 2009).

De este modo, considerando la implicación del canal TRPV1 en la generación del dolor y su relevancia como diana terapéutica, el presente estudio pretende aprovechar el poder de cómputo disponible para así aventurarnos en el desarrollo de una estrategia computacional, soportada con validación experimental, para la identificación de nuevos activadores del canal TRPV1. Tomando ventaja de las estructuras tridimensionales del canal TRPV1 disponibles, esta estrategia de búsqueda racional apuntará a la predicción y caracterización del modo de unión de capsaicina en el sitio propuesto de unión de compuestos vaniloides. De este modo, usando esta caracterización como referencia, además de descriptores moleculares como la hidrofobicidad de cada molécula, se intentará discriminar posibles agonistas del canal TRPV1 entre cientos de miles de moléculas pequeñas contenidas en bases de datos públicas. Así, este trabajo pretende aportar con nuevos compuestos líderes, más potentes que capsaicina, como punto de partida para modificación química y para la generación de propiedad intelectual a partir de ellos. Además, mediante la caracterización de los determinantes moleculares que median la interacción de ligandos agonistas con el canal, se espera continuar contribuyendo al entendimiento sobre el mecanismo de activación dependiente de ligando del canal TRPV1.

### **3. Hipótesis:**

Basándose en los antecedentes experimentales, se plantea que: “El bolsillo de unión de vaniloides puede ser utilizado como blanco para la búsqueda racional de nuevas moléculas activadores de TRPV1, análogas de capsaicina.”

### **4. Objetivos:**

#### **4.1. Objetivo General:**

Buscar nuevos activadores de TRPV1, análogos a capsaicina, a través de una estrategia teórico-experimental, la que involucra la implementación de herramientas de acoplamiento molecular masivo sobre el bolsillo hidrofóbico de unión a vaniloides en TRPV1 y la posterior validación experimental de las nuevas moléculas a través de ensayos electrofisiológicos.

#### **4.2. Objetivos Específicos:**

- Caracterización de la red de interacciones entre la CAP y TRPV1 a través de simulaciones de docking.
- Implementar herramientas de *docking* masivo utilizando los patrones estructurales de la interacciones CAP-TRPV1 y bases de datos de moléculas pequeñas disponibles en el mercado.
- Evaluación de diferentes métodos de puntaje para la selección de las moléculas que serán probadas experimentalmente.
- Análisis de resultados de ensayos electrofisiológicos (en colaboración con el CINV, Valparaíso) y evaluación de la correlación estructura-función entre las moléculas con mejor actividad biológica.

## **5. Metodología:**

### **5.1. Preparación del receptor protéico y de ligandos pequeños:**

Para la implementación del protocolo computacional para el descubrimiento de nuevos análogos de capsaicina, las estructuras tridimensionales del canal y cada ligando a ser testeado *in silico* son requeridas. La estructura del canal TRPV1 resuelta por criomicroscopía electrónica en complejo con resiniferatoxina (RTx) y la toxina de doble nudo (DkTx), fue seleccionada como receptor (PDB ID: 3J5Q) (Cao, *et al.*, 2013; Liao, *et al.*, 2013). Esta fue obtenida desde la base de datos Protein Data Bank ([www.rscb.org](http://www.rscb.org); Berman, *et al.*, 2014) en formato .pdb, el que contiene las coordenadas atómicas para cada átomo de la proteína. El receptor fue preparado utilizando AutoDock Tools (Morris, *et al.*, 2008) y el proceso consistió en la adición de los hidrógenos faltantes a la estructura, además del cálculo de cargas parciales para cada átomo. Luego se generó una representación de tipo united-atom de la macromolécula, en la cual solo se encuentran de manera explícita los átomos de hidrógeno polares (por ejemplo en –OH), mientras que los no polares son representados mediante la adición de sus cargas parciales al átomo pesado al cual están unidos (como en –CH<sub>3</sub>). El receptor preparado fue almacenado en formato .pdbqt de AutoDock, el que consiste en una estructura en formato Protein Data Bank (**pd**bd**qt**) en conjunto a sus cargas parciales (pd**bd**qt) y los tipos de átomo de AutoDock (pd**bd**qt).

Los ligandos pequeños a testear fueron obtenidos desde la base de datos ZINC<sup>12</sup> (Irwin, *et al.*, 2005) en formato .mol2, correspondiente a una representación de tipo atomística de la molécula en conjunto a sus cargas atómicas y a la conectividad entre átomos. Estos fueron preparados utilizando la caja de herramientas quimioinformática OpenBabel (O'Boyle, *et al.*, 2011), la cual realiza los mismos pasos descritos para el receptor, además de determinar los enlaces rotables, indicando los grados de libertad conformacional de la molécula. Los estados de protonación de las moléculas no fueron modificados, ya que la representación 3D disponible en la base de datos ZINC<sup>12</sup> corresponde al estado más probable para los ligandos a pH 7.0 (Irwin, *et al.*, 2005) predicho mediante LigPrep (LigPrep, version 2.9, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014). Cada ligando fue almacenado en formato .pdbqt como se describió anteriormente.

## 5.2. Simulación de acoplamiento molecular de capsaicina:

Para determinar el espacio en el cual la búsqueda conformacional será ejecutada (grilla), el sitio de unión a capsaicina fue inspeccionado visualmente identificando los residuos relevantes para la unión de compuestos vaniloides descritos en la literatura (Boukalova, *et al.*, 2010; Cao, *et al.*, 2013; Chou, *et al.*, 2004; Gavva, *et al.*, 2004; Jordt y Julius, 2002; Kym., *et al.*, 2009; Liao, *et al.*, 2013; Susankova, *et al.*, 2007, Winter, *et al.*, 2013). Utilizando el software VMD (Humphrey, *et al.*, 1996), el centro de la grilla fue calculado mediante el cálculo de la media aritmética de las coordenadas cartesianas de los carbono  $\alpha$  de los residuos TYR511, MET547, THR550, GLU570 y LEU669 de la subunidad D del canal. El tamaño del espacio de búsqueda fue definido con el fin de cubrir el sitio de unión por completo, resultando en una grilla de dimensiones 20 Å x 20 Å x 30 Å en los ejes X, Y y Z respectivamente. Para observar si los resultados de una simulación de acoplamiento molecular convergen en el sitio de unión, se realizó una simulación de prueba con los parámetros por defecto (exhaustiveness = 8; num\_modes = 9) usando el software Autodock Vina (Trott y Olson, 2009).

Con el fin de intentar predecir el modo de unión de capsaicina y debido a la naturaleza estocástica del algoritmo genético Lamarckiano implementado para la búsqueda conformacional en el software seleccionado (Kitchen, *et al.*, 2004; Morris, *et al.*, 1998), se realizaron 50 simulaciones de acoplamiento molecular independientes usando los parámetros por defecto que se mencionaron anteriormente. Para observar la convergencia de los resultados, la pose de menor energía de unión predicha de cada una de las simulaciones fue sobrepuesta en el sitio de unión usando VMD. Se evaluó la ocurrencia de cada uno de los conformeros entre las poses de menor energía de unión predicha de las 50 simulaciones y se seleccionó la más representada. Luego se construyó un complejo proteína-ligando en formato .pdb, y las interacciones fueron optimizadas mediante la minimización energética del complejo con restricciones en el *backbone*, utilizando el campo de fuerza OPLS-AA (Robertson, *et al.*, 2015) en la suite Maestro de Schrödinger (Maestro, versión 9.8, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014). Las interacciones proteína-ligando fueron evaluadas para el complejo optimizado usando la herramienta 2D Ligand Interaction Diagram de la misma suite con parámetros por defecto, a excepción del



reconocimiento de puentes de hidrógeno. En este caso se utilizó el valor umbral de distancia para su reconocimiento de 3,1 Å y un ángulo de desviación máximo de 120° entre el par dador-aceptor.

### 5.3. Acoplamiento molecular masivo:

Una simulación de acoplamiento molecular comprende la búsqueda en el espacio conformacional de una sola molécula a la vez. En este caso, el interés es testear una base de datos de compuestos, por lo que el acoplamiento molecular masivo comprende el realizar esta búsqueda en el espacio conformacional de múltiples moléculas de forma secuencial e independiente. Las moléculas testeadas mediante acoplamiento molecular masivo comprenden un set de la base de datos ZINC<sup>12</sup>, las cuales se encuentran comercialmente disponibles. Las simulaciones de acoplamiento molecular fueron realizadas usando el software Autodock Vina con los parámetros por defecto, utilizando el espacio de búsqueda determinado en 5.2. Los resultados fueron ordenados de forma creciente en términos de su energía de unión predicha y se seleccionaron los 500 mejores ligandos mediante este criterio.

### 5.4. Búsqueda de las características químicas relevantes de capsaicina involucradas en la interacción proteína-ligando:

Una hipótesis de farmacóforo consiste en una descripción abstracta de las características moleculares relevantes que son necesarias para el reconocimiento de un ligando por su blanco biológico, como por ejemplo, un grupo donador de puentes de hidrógeno (Leach, 2010; Rudolph, 1997, Van Drie, 1996; Van Drie, 2007). Mediante la identificación de las características relevantes de capsaicina en la descripción bidimensional de las interacciones proteína-ligando determinadas en 5.2, se construyó una hipótesis de farmacóforo tridimensional para esta molécula líder utilizando el módulo Phase de la suite Maestro (Phase, version 3.9, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014), la cual le asigna coordenadas en el espacio cartesiano a cada uno de los sitios relevantes.

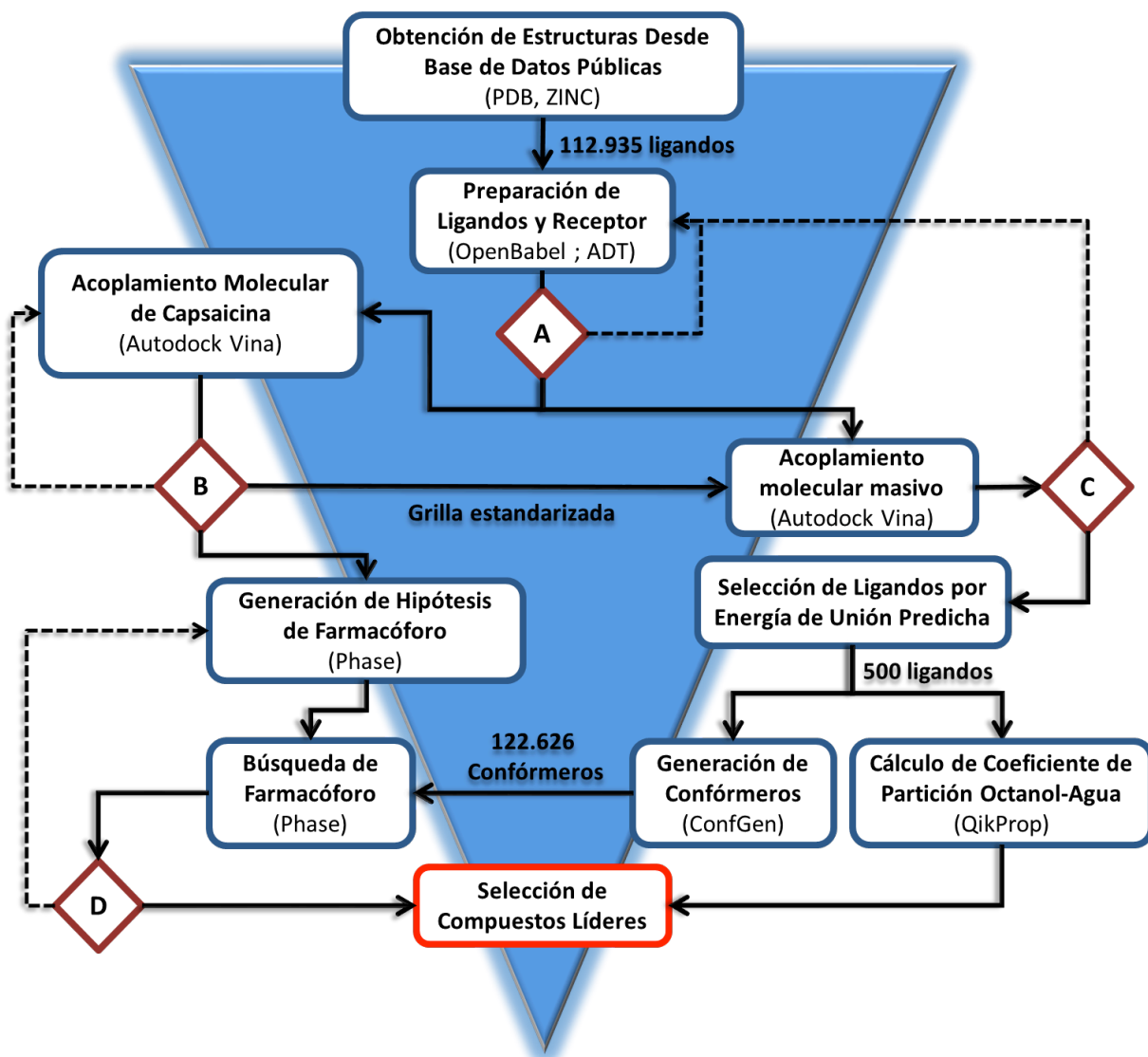
### 5.5. Selección de compuestos para validación experimental:

Para la selección de los ligandos más promisorios para ser probados de forma experimental, se requieren descriptores adicionales para los mejores ligandos seleccionados en 5.3. Para predecir la capacidad de los ligandos de alcanzar el sitio de unión, se calculó el coeficiente de partición octanol-agua ( $\log P_{\text{oct/wat}}$ ) usando QikProp (QikProp, version 4.0, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014) para cada una de las 500 moléculas previamente seleccionadas y para los dos agonistas conocidos de TRPV1, capsaicina y resiniferatoxina. Este descriptor corresponde a una medida adimensional, utilizado para determinar cuan hidrofóbica o hidrofílica es una molécula. Es determinado experimentalmente por la capacidad de una molécula de difundir y disolverse entre dos fases inmiscibles, comprendiendo una de un solvente polar (agua) y una de solvente orgánico (octanol) (Kujawski, et al., 2012). El coeficiente de partición octanol-agua corresponde al cociente entre la concentración de soluto en cada una de las fases, de este modo, si el ligando prefiere la fase orgánica, entonces el resultado de este cálculo es mayor a cero, de lo contrario, este parámetro es negativo. Numéricamente se puede representar mediante la siguiente expresión:

$$\log P_{\text{oct/wat}} = \log \left( \frac{[\text{solute}]_{\text{octanol}}}{[\text{solute}]_{\text{water}}} \right)$$

Otro descriptor clave para la selección es la capacidad del ligando de satisfacer el modo de unión de capsaicina. Para esto, una librería de confórmeros fue construida para los 500 ligandos seleccionados más resiniferatoxina utilizando ConfGen (ConfGen, version 2.8, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014). Se realizó una generación de confórmeros ‘Comprehensive’ para cada ligando, en donde se solicitaron 75 confórmeros por enlace rotatable, eliminando aquellos con un RMSD bajo 0,5 Å y cuya energía esté sobre 120 kcal/mol que el confórmero de menor energía. Posteriormente se realizó una búsqueda de farmacóforo en la

librería de confórmeros generada, utilizando la herramienta Advance Pharmacophore Screening del módulo Phase considerando la hipótesis tridimensional de capsaicina desarrollada en 5.4. La función de puntuación fue utilizada por defecto y para la identificación de coincidencias se estableció que debían coincidir al menos cuatro de las cinco características relevantes determinadas para capsaicina, con una tolerancia máxima de 2 Å. Se solicitó al menos una coincidencia por ligando, con un máximo de 1000 coincidencias para el ensayo. Los resultados fueron ordenados por la capacidad de satisfacer el modelo de farmacóforo tridimensional de capsaicina en orden decreciente. Se seleccionaron los mejores diez resultados de la búsqueda de farmacóforo que poseían un coeficiente de partición octanol-agua similar o mayor al de capsaicina. La inspección visual del modo de unión predicho para los diez ligandos fue llevada a cabo para seleccionar a aquellos más parecidos a capsaicina. En la figura 8 se muestra un diagrama de flujo representando todas las etapas de la estrategia computacional.



**Figura 8.** Esquema del diseño de la estrategia computacional implementada. Se muestra un diagrama de flujo representando las distintas etapas de la estrategia computacional desarrollada para la búsqueda de nuevos posibles análogos de capsaicina. Las etapas que requieren la implementación de una estrategia de cálculo computacional se representa en azul. Los diamantes rojos representan los puntos de control, en donde se necesita extensiva revisión manual de los resultados y su validación con lo reportado en la literatura. Las flechas continuas representan el avance del proceso desde una etapa a la siguiente, mientras que las líneas punteadas representan ciclos iterativos dependientes de la revisión y validación de los resultados. El cuadro rojo representa el final del proceso.

### 5.6. Validación experimental:

La validación experimental se realizó en colaboración al grupo de investigación del doctor Ramón Latorre por el doctor Ignacio Díaz Franulic, en el Centro Interdisciplinario de Neurociencias de Valparaíso, según el protocolo adjunto:

La validación experimental se realizó mediante pinza de voltaje de dos electrodos o *Two Electrode Voltage Clamp* (TEVC). Para esto, ovocitos de *Xenopus laevis* fueron atravezados con dos electrodos capilares de Ag/AgCl llenos con 3M KCl y con resistencias en el rango 0.2 - 1.0 MΩ (Guan, *et al.*, 2013). Los registros fueron realizados con un amplificador OC-725C (Warner Instruments) a través de una interface PCI-6035 (National Instruments), comandada por el software pCLAMP (Molecular Devices). Las soluciones normales de registro corresponden a NaCl 100mM, KCl 2.5mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM y Hepes-NaOH 10mM (pH 7.4). Las sales fueron adquiridas desde Sigma-Aldrich. La síntesis in vitro de cRNA fue llevada a cabo con Message Machine kit (Ambion) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El cuidado de los individuos de *Xenopus laevis*, cirugía y preparación de ovocitos se han descrito anteriormente (Guan, *et al.*, 2013).

Para determinar la activación de TRPV1, la amplitud de la corriente generada por un pulso depolarizante de +30mV fue medida antes y después de exposición a los compuestos. La activación máxima del canal fue probada con una concentración saturante de capsaicina (50μM) y la activación del canal a cada concentración declarada fue normalizada según la respuesta máxima en la presencia de capsaicina. Se realizaron cinco experimentos independientes y se reporta el promedio de estos con sus desviaciones estándar (SD) correspondientes.

### 5.7. Simulación de dinámica molecular de capsaicina y el mejor análogo en membrana:

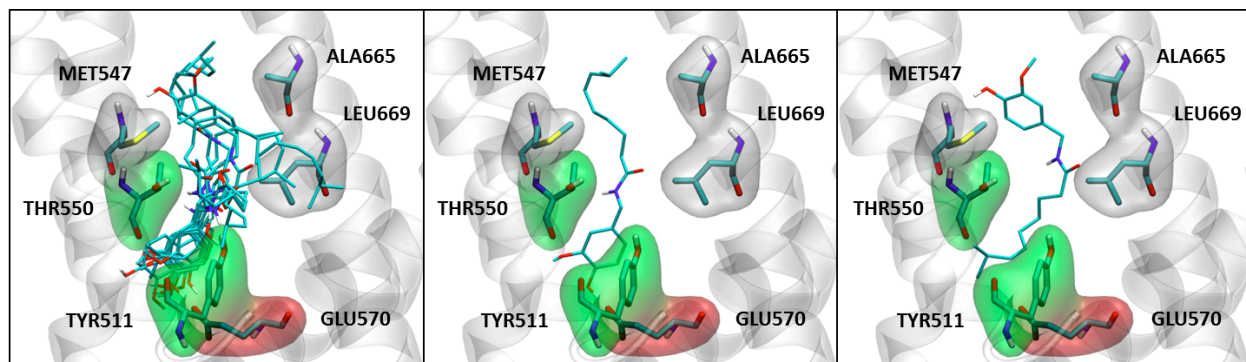
Para llevar a cabo las simulaciones de dinámica molecular, se generó un sistema para cada uno de los ligandos seleccionados. Cada sistema consiste en una bicapa lipídica de tipo POPC (1-

palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina) de dimensiones 100 Å x 100 Å. Se dispuso seis ligandos por la cara superior de la membrana en posiciones al azar para cada sistema y procurando una distancia de a lo menos 25 Å entre ellos. El sistema fue solvatado en una caja de agua de tipo TIP3 (Jorgensen, *et al.*, 1983) y fue neutralizado con 0,15 mM de KCl para asegurar neutralidad eléctrica. El protocolo de preparación de la simulación consistió en un periodo inicial de equilibrado, seguido por 5000 pasos de minimización de energía. Posteriormente, en la etapa de simulación, se aplicaron restricciones a los ligandos para fijarlos durante 5 ns, las que fueron retiradas de manera paulatina durante ese periodo. Luego, el sistema fue simulado libre de restricciones por 20 ns. Las simulaciones de dinámica molecular se llevaron a cabo en un ensamble canónico de tipo NPT (masa, presión y temperatura constante) (Leach, 2001) con condiciones periódicas de borde, en una celda periódica (Leach, 2001) a 300K (~27°C), utilizando el software NAMD2.10 (Phillips, *et al.*, 2005) y el campo de fuerza CHARMM36 (Best, *et al.*, 2012). Se aseguró la constancia de la presión utilizando el modelo del pistón de Langevin (Feller, *et al.*, 1995; Martyna, *et al.*, 1994) y para compensar las variaciones de volumen se autorizó la utilización de una celda flexible. La temperatura fue mantenida constante utilizando el termostato de Langevin (Hünenberger, P., 2005). Los parámetros para capsaicina y el mejor análogo fueron obtenidos desde el servidor ParamChem, utilizando el campo de fuerza CGenFF (Vanommeslaeghe, *et al.*, 2009), habilitando la opción de transferencia de parámetros.

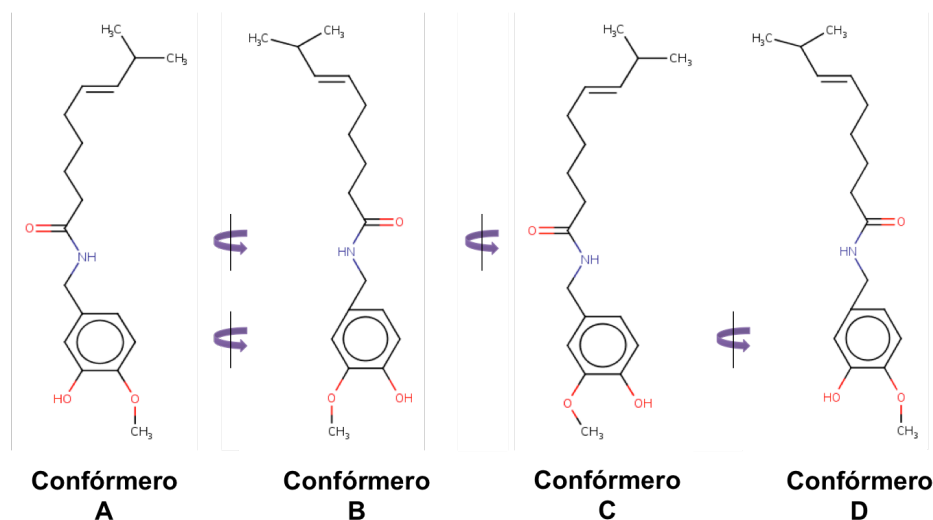
## 6. Resultados:

### 6.1. Predicción del modo de unión de capsaicina:

La Figura 9 muestra los resultados de la primera simulación de acoplamiento molecular. En esta se revela que la conformación preferida del ligando corresponde a aquella en que la orientación del grupo vaniloide se encuentra enfrentando a residuo TYR511, y su grupo trans-2-metil-3-hepteno se aloja en el contexto de los residuos hidrofóbicos del sitio, conformación que será llamada CAP<sub>down</sub> de aquí en adelante. La energía de unión predicha es de -7.2 kcal/mol para esta conformación. Si se sobreponen las nueve poses resultantes de esta simulación de acoplamiento molecular, se puede observar que todas las poses obtenidas convergen dentro del sitio de unión, con una desviación promedio (RMSD) de  $2,94 \pm 1.90$  Å entre ellas. Cabe destacar que solo ocho de nueve poses se encuentran en la configuración CAP<sub>down</sub>, observándose una ocurrencia de la configuración inversa (CAP<sub>up</sub>), en la cual el grupo trans-2-metil-3-hepteno se encuentra enfrentando al residuo TYR511 del canal y el anillo se encuentra en la vecindad de los residuos MET547, ALA665 y LEU669. La energía de unión predicha para esta conformación es de -6,7 kcal/mol.



**Figura 9.** Acoplamiento molecular de capsaicina. Se muestra el resultado del primer acoplamiento molecular de capsaicina en el canal TRPV1 (PDB ID: 3J5Q). El primer panel presenta los nueve resultados de la simulación de acoplamiento molecular sobrepuestos, mostrando la convergencia de los resultados mediante la formación de un solo cluster de conformeros en el sitio de unión. El segundo panel presenta la conformación de capsaicina CAP<sub>down</sub>, en la cual el anillo vaniloide se encuentra enfrentando al residuo TYR511. El último panel presenta la conformación CAP<sub>up</sub> en la que el anillo vaniloide se encuentra en la vecindad de los residuos MET547, ALA665 y LEU669.

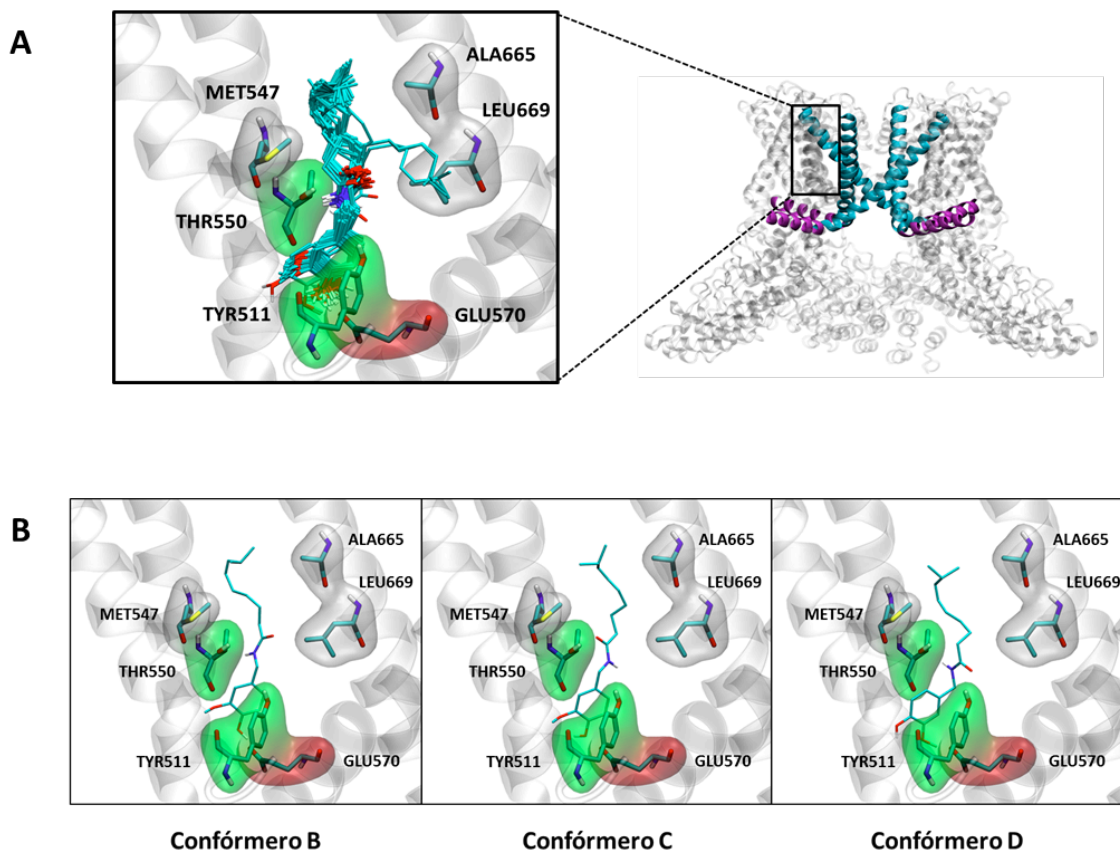


**Figura 10.** Confórmeros definidos para la identificación del mejor modo de unión de capsaicina. Los confórmeros fueron definidos en base a la configuración  $CAP_{down}$  y se obtuvieron a través de la representación de la molécula luego de la rotación secuencial en  $180^\circ$  de las regiones A y B del ligando (Walpole, et al., 1996), simbolizado por la flecha violeta.

Según lo observado, se puede concluir que la conformación  $CAP_{down}$  es representativa dentro de la población de confórmeros obtenidos en este primer ensayo. Cabe destacar que el nitrógeno del grupo N-metilacetamida tanto en la conformación  $CAP_{up}$  y  $CAP_{down}$ , se encuentra enfrentando al residuo THR550. Posteriormente, al sobreponer la mejor pose resultante de cada una de las 50 simulaciones de acoplamiento molecular (Figura 11), se puede observar que en todos los casos el anillo vaniloide del ligando enfrenta al residuo TYR511. Entre los confórmeros se observa una mayor variabilidad en la zona con mayor flexibilidad de la molécula, correspondiente al grupo trans-2-metil-3-hepteno. De este modo, es posible observar que la conformación  $CAP_{down}$  es la más representada dentro de las poses de menor energía; sin embargo es necesario el identificar la correcta configuración de los grupos funcionales del ligando para intentar descifrar las interacciones relevantes que median su unión con el receptor. Para esto se definieron cuatro posibles confórmeros para capsaicina, considerando dos ejes de simetría que corresponden al grupo N-metilacetamida y el tándem de los grupos metoxi e hidroxí presentes en el anillo vaniloide (Figura 10). Al realizar el conteo de ocurrencia de cada uno de los confórmeros dentro de las 50 poses analizadas, se observa que el confórmero B es el más



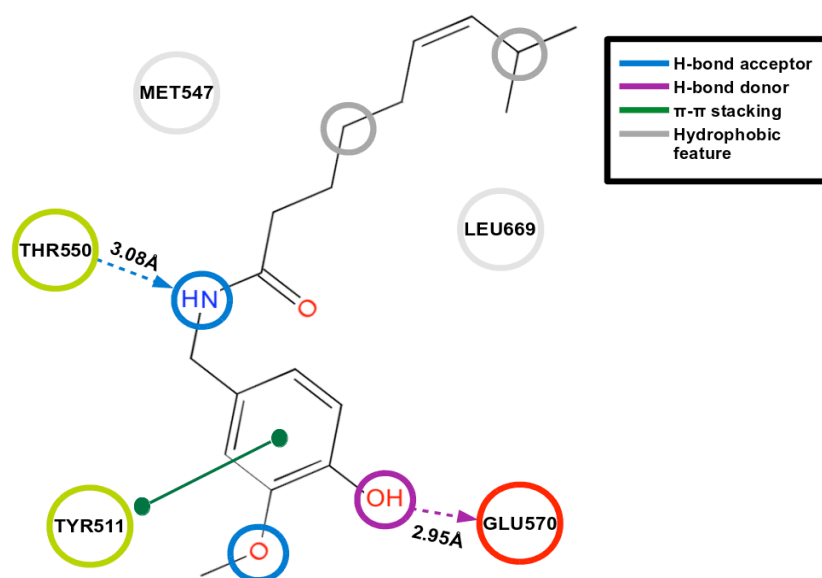
representado con 39 ocurrencias. Este es seguido por el conformero C con 9 ocurrencias, el conformero D con 2 ocurrencias y el conformero A con 0 ocurrencias. Así, el conformero B fue considerado para la identificación de las interacciones más relevantes del ligando para este modo de unión.



**Figura 11.** Determinación del modo de unión más probable de capsaicina. **A.** Superposición del mejor resultado de cada una de las 50 simulaciones de acoplamiento molecular de capsaicina. Se observa la convergencia de los resultados de las simulaciones independientes. **B.** Conformeros observados entre los resultados de las 50 simulaciones de acoplamiento.

Para identificar las interacciones entre el ligando y el receptor, se utilizó el resultado que presentó la menor energía de unión (-7,2 kcal/mol) de la población del conformero B. El análisis revela la posibilidad de formación de puentes de hidrógeno de dos grupos funcionales del ligando

con residuos del sitio de unión. Se determinó que el grupo hidroxil localizado en el anillo vaniloide puede donar un puente de hidrógeno a la cadena lateral del residuo GLU570. Del mismo modo, el grupo amida puede aceptar un puente de hidrógeno de la cadena lateral del residuo THR550, pero para que este sea considerado fue necesario aumentar el umbral para el reconocimiento de este tipo de enlaces a 3,1Å. Adicionalmente, se identificaron dos centros hidrofóbicos relevantes que interactúan principalmente con los residuos MET547 y LEU669. Las interacciones determinadas para esta conformación de capsaicina pueden ser observadas con mayor detalle en la Figura 12.



**Figura 12.** Diagrama de las interacciones identificadas para capsaicina. Se muestra de forma esquemática los residuos del sitio de unión a vaniloides que interactúan con capsaicina, coloreados según sus propiedades fisicoquímicas como se describió anteriormente. Los grupos funcionales de capsaicina identificados como dadores de puentes de hidrógeno se muestran coloreados en violeta, mientras que los grupos aceptores de puentes de hidrógeno se muestran en azul. Las flechas discontinuas indican la direccionalidad del enlace de hidrógeno, mostrando la relación dador-aceptor. La interacción de tipo  $\pi$ - $\pi$  determinada entre el anillo vaniloide de capsaicina y el residuo TYR511 se muestra como una línea continua de color verde.

## 6.2. Resultados del acoplamiento molecular masivo:

El acoplamiento molecular masivo revela ligandos con una mayor afinidad predicha por el sitio de unión a vaniloides, en comparación a lo observado para capsaicina. Al realizar el *ranking* de los 1000 mejores ligandos en términos de su energía de unión calculada, se puede observar que capsaicina no logra entrar a el, encontrándose sobre el lugar 3000 con una energía de unión predicha de -7,0 kcal/mol, siendo -10,6 kcal/mol la energía de unión calculada para el mejor ligando resultante del ensayo de acoplamiento molecular masivo. En este paso, se incluyó además a resiniferatoxina, la que se encuentra en el lugar 72 del ranking con una energía de unión predicha de -9,6 kcal/mol. En la Tabla 1 se puede observar los diez mejores resultados comparados contra capsaicina, incluyendo la diferencia en sus coeficientes de partición octanol-agua ( $\Delta\text{LogP}$ ).

**Tabla 1.** Mejores resultados del acoplamiento molecular masivo. Las columnas corresponden al lugar ocupado en el ranking, al nombre de la molécula en la base de datos local, el código de acceso en la base de datos ZINC12, su energía de unión predicha y su coeficiente de partición octanol-agua respectivamente. El parámetro  $\Delta\text{LogP}$  representa la disimilitud en hidrofobicidad de la molécula con respecto a capsaicina, representado como la diferencia entre sus coeficientes de partición octanol-agua ( $\Delta\text{LogP} = \text{LogP}_{\text{ligando}} - \text{LogP}_{\text{capsaicina}}$ ).

#	Ligando	ZINC ID	Binding Energy (kcal/mol)	LogPo/w	$\Delta\text{logP}$
1	Ligando_060975	ZINC00651626	-10,6	5,0	1,4
2	Ligando_019510	ZINC01564289	-10,3	11,3	7,7
3	Ligando_045721	ZINC02388653	-10,3	5,2	1,6
4	Ligando_080657	ZINC09056730	-10,3	6,4	2,8
5	Ligando_061132	ZINC00843994	-10,3	4,2	0,6
6	Ligando_092966	ZINC04218138	-10,2	4,7	1,1
7	Ligando_062205	ZINC08441119	-10,2	7,7	4,1
8	Ligando_050013	ZINC06245358	-10,2	6,7	3,1
9	Ligando_059980	ZINC91690333	-10,2	4,3	1,3
10	Ligando_049799	ZINC08445950	-10,2	6,9	3,3
3126	Ligando_Capsaicina	ZINC01530575	-7,0	3,6	0,0

Si se comparan las estructuras de los mejores diez ligandos contenidos en la Tabla 1, se puede observar una marcada presencia de estructuras aromáticas cíclicas (Figura suplementaria

Y). Como consecuencia, sus respectivos coeficientes de partición octanol-agua tienden a ser mayores en comparación al de capsaicina, lo que indica una mayor hidrofobicidad predicha de las moléculas analizadas. Otra característica relevante es la presencia de sustituyentes de tipo halógeno como cloruro y fluoruro, en cinco de las diez estructuras. En este paso se consideraron únicamente las primeras 500 moléculas del ranking sin importar sus características estructurales o su coeficiente de partición octanol-agua. El rango de energía de unión predicho contenido por esta selección, comprende el intervalo desde -10,6 kcal/mol a -8,9 kcal/mol. Del mismo modo, el rango de coeficiente de partición que comprende la selección, contiene moléculas con un coeficiente de partición desde 0.91 a 11.44 unidades. En la figura 13 se muestran la conformación de menor energía de los tres primeros ligandos del ranking.

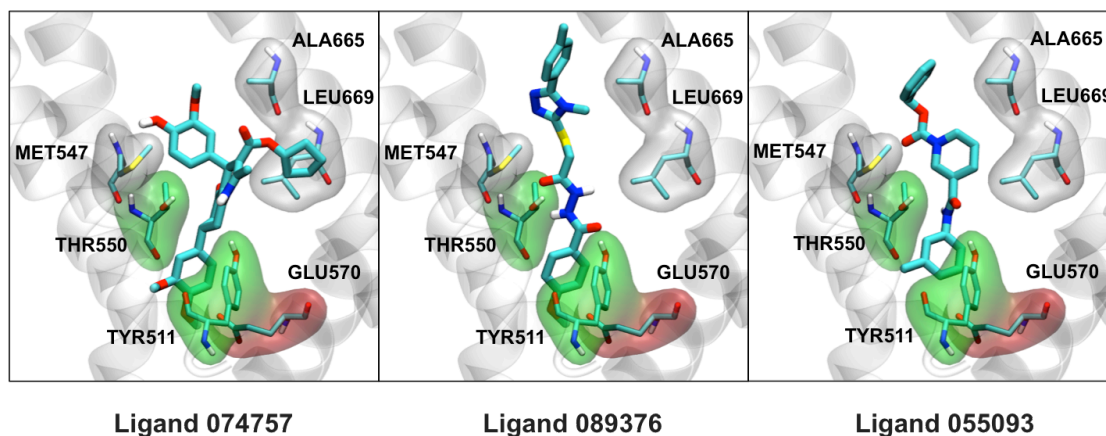
### 6.3. Selección de los mejores candidatos:

Utilizando la información sobre los contactos generada en 5.4 (Figura 12), se definió la hipótesis de farmacóforo para capsaicina. Así, el grupo hidroxilo del anillo vaniloide fue considerado como dador de puentes de hidrógeno y el grupo amino se consideró tanto aceptor como dador de puentes de hidrógeno. Solamente se consideró un centro hidrofóbico, que corresponde al más cercano al grupo N-metilacetamida, con el fin de relajar el criterio de búsqueda. La hipótesis de farmacóforo generada, contiene la secuencia **ADDHR** y corresponde a *H-bond Aceptor*, *H-bond Donor*, *H-bond Donor* y *Ring feature*. Además de los 500 mejores ligandos obtenidos mediante el ranking por energía de unión predicha, se incluyó a resiniferatoxina en el análisis. Posteriormente se generó una librería de confórmers conteniendo 122.626 entradas, con un promedio de 245 confórmers por ligando. La Tabla 2 muestra los resultados de la búsqueda de moléculas que satisfagan la hipótesis de farmacóforo desarrollada. De este modo, se obtuvieron 1000 compuestos ordenados por su capacidad de satisfacer el modo de unión determinada para capsaicina. Los primeros diez compuestos se consideraron para el posterior análisis. La Tabla 2 muestra los diez mejores resultados de la búsqueda de moléculas que satisfacen la hipótesis de farmacóforo desarrollada para capsaicina. Como mejor resultado de la búsqueda se obtuvo a capsaicina en primer lugar, lo que era esperable. El análogo ultrapotente

**Tabla 2.** Resultados de la búsqueda de moléculas que satisfagan el modo de unión de capsaicina. Se muestran las mejores diez moléculas resultantes de la búsqueda ordenadas de forma decreciente dependiendo de cuan bueno es el ajuste de sus características farmacofóricas con la hipótesis generada. Los agonistas conocidos de TRPV1, capsaicina y resiniferatoxina, se incluyeron como referencia para comparar la hidrofobicidad predicha de las moléculas seleccionadas.

#	Ligando	ZINC ID	Binding Energy (kcal/mol)	LogPo/w	$\Delta\log P$
-	Ligando_Capsaicina	ZINC01530575	-7,0	3,6	0,0
1	Ligando_089376	ZINC00876290	-9,1	4,3	0,7
2	Ligando_028142	ZINC00895447	-9,3	4,1	0,5
3	Ligando_103674	ZINC02507574	-9,4	5,6	2,0
4	Ligando_067659	ZINC71774691	-9,2	4,8	1,2
5	Ligando_074626	ZINC35224090	-9,6	4,4	0,8
6	Ligando_086427	ZINC04716536	-8,9	5,7	2,1
7	Ligando_074757	ZINC00650347	-9,3	6,2	2,6
8	Ligando_055093	ZINC91690162	-9,2	4,7	1,1
9	Ligando_055133	ZINC91690164	-9,2	4,7	1,1
10	Ligando_059345	ZINC00649393	-9,0	5,8	2,2
34	Ligando_RTx	ZINC04097944	-9,6	5,8	2,2

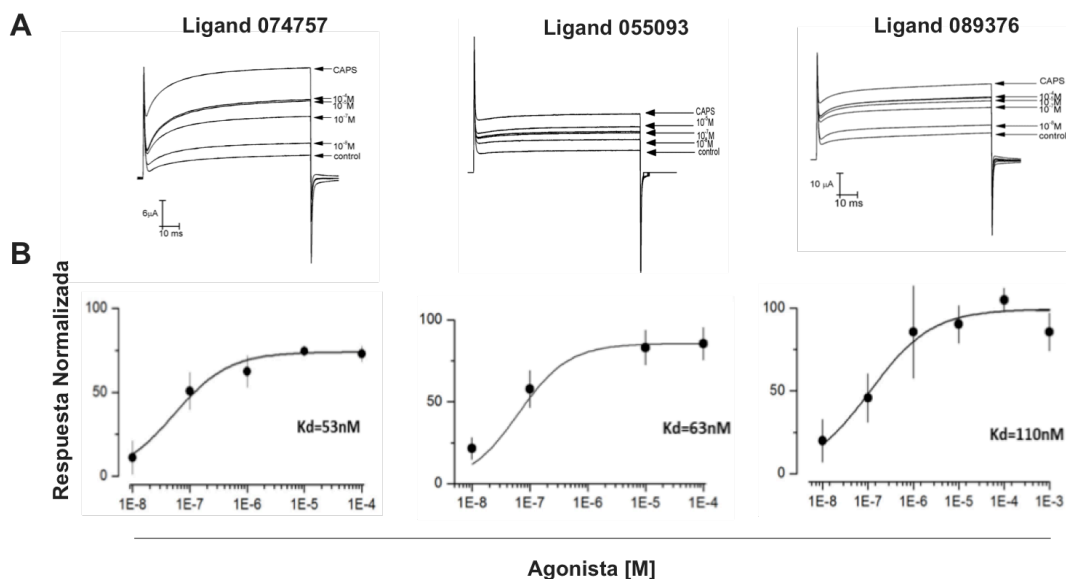
de capsaicina, resiniferatoxina, se ubica en el lugar 34 del ranking. En la Tabla 2 se incluyó este análogo para poder comparar el coeficiente de partición de las mejores moléculas encontradas. Se puede observar que las diez mejores moléculas resultantes de la búsqueda poseen un coeficiente de partición octanol-agua mayor al de capsaicina y menor al de resiniferatoxina, exceptuando la molécula Ligand\_074757, la que posee un coeficiente de partición octanol-agua de 6,2. En la Figura suplementaria 3 se muestran las estructuras de los diez mejores resultados contenidos en la Tabla 2. Para la selección de compuestos líderes se realizó la inspección del modo de unión de estos, seleccionándose los tres más parecidos a capsaicina, tanto en estructura como en modo de unión. En este paso se descartaron las estructuras que contuvieran grupos halógenos por la complejidad que presenta el obtener sus parámetros para el campo de fuerza CHARMM, con el objetivo de ser utilizados posteriormente en simulaciones de dinámica molecular. Para esto se requieren cálculos sofisticados de mecánica cuántica en diferentes niveles de teoría (Besler, *et al.*, 1990). En la Figura 13 se muestran el modo de unión de los ligandos seleccionados para la subsecuente validación experimental.



**Figura 13.** Ligandos seleccionados para validación experimental. Se muestra la pose de menor energía obtenida desde los resultados del acoplamiento molecular masivo. Se puede observar en todos los casos la presencia de sustituyentes capaces de interactuar con el residuo THR550 mediante la formación de puente de hidrógeno, consecuente al modelo desarrollado para capsaicina. Además se puede observar un empaquetamiento de tipo  $\pi$ - $\pi$  entre cada ligando y el residuo TYR511 del canal TRPV1.

#### 6.4. Validación experimental:

La validación experimental fue realizada por el doctor Ignacio Díaz Franulic, en colaboración al grupo de investigación del doctor Ramón Latorre, en el Centro Interdisciplinario de Neurociencias de Valparaíso. La técnica seleccionada corresponde a la pinza de voltaje de dos electrodos (*Two Electrode Voltage Clamp*, TEVC), la que permite medir la actividad de canales iónicos mediante el registro de la corriente que pasa a través de la membrana de ovocitos de *Xenopus Laevis* expresando de manera heteróloga canales TRPV1. En la figura 14 se muestran los registros para cada compuesto (Figura 14A) y su relación dosis-respuesta en escala logarítmica (Figura 14B). Mediante el uso de concatémoros del canal TRPV1, se determinó que una molécula de agonista es suficiente para activar el canal muy cerca del máximo efecto, incluso en aquellos que poseían intacto un solo sitio de unión (Hazan, *et al.*, 2015). De este modo es posible asumir un modelo de un solo sitio de unión. En este contexto, la concentración efectiva media ( $EC_{50}$ ) debería ser equivalente a la constante de disociación ( $K_d$ ).



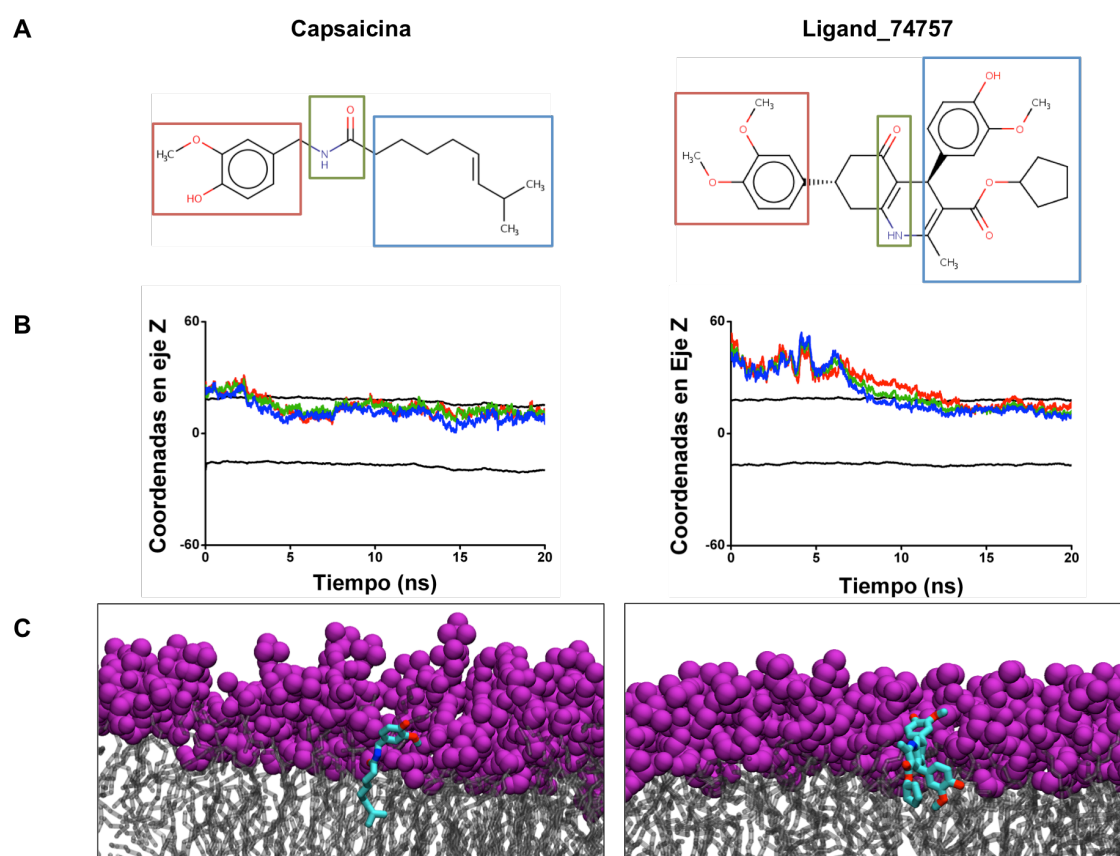
**Figura 14.** Registros electrofisiológicos de las corrientes de TRPV1 dependientes de agonista. **A.** Se muestra los registros de las corrientes iónicas evocadas por capsaicina determinadas en colaboración con el Centro Interdisciplinario de Neurociencias de Valparaíso (CINV) a diferentes concentraciones de las moléculas testeadas. **B.** Curvas dosis-respuesta en escala logarítmica para cada uno de los compuestos testeados, normalizada por la mayor corriente evocada por capsaicina.

### 6.5 Comportamiento de capsaicina y el mejor análogo en membrana:

Para poder evaluar el comportamiento de ambos ligandos en una membrana de lípidos, fue necesario definir las estructuras análogas a las regiones A, B y C de capsaicina (Figura 1) en el ligando Ligand\_74757. De este modo, para la identificación de estas regiones se consideró la pose de acoplamiento molecular mostrada en la Figura 13, donde la región del anillo que enfrenta al residuo TYR511 fue homologado al segmento A de capsaicina, mientras que la región que enfrenta al residuo THR550 se homologó al segmento B. La porción de la molécula orientada en la vecindad de los residuos MET547, ALA665 y LEU669 fue finalmente homologado al segmento C (Figura 15A). Se calculó el centro de masa de cada uno de los segmentos para capsaicina y el mejor ligando utilizando el programa VMD, y de este modo se pudo obtener las cartesianas en el eje Z para cada segmento. Se realizó el mismo ejercicio para los grupos fosfato de los lípidos, de este modo se puede obtener una referencia sobre la ubicación de la membrana.



Luego del periodo de equilibrado del sistema, donde los ligandos se encuentran con restricciones, se puede observar capsaicina penetra rápidamente la bicapa lipídica para localizarse en la interface de esta, probablemente por su proximidad a la membrana al inicio de la simulación. Por el contrario, el mejor análogo tarda aproximadamente 7 nanosegundos en alojarse en la interface. Si bien estructuralmente, capsaicina y el mejor ligando son bastante disímiles, la localización de los grupos homologados es prácticamente la misma. En la Figura 15C se puede observar la localización de ambos ligandos en la interface. De forma complementaria, la figura 15B muestra la localización de los segmentos en el eje Z a lo largo de la trayectoria.



**Figura 15.** Comportamiento de capsaicina y el mejor análogo en la membrana. **A.** Se muestra la homologación de segmentos descritos para capsaicina (Walpole,*et al.*, 1996) en el mejor análogo según la pose de docking. **B.** Localización en el tiempo del centro de masa de los segmentos A (trazo rojo), B (trazo verde) y C (trazo azul). Los límites de membrana muestran en negro. **C.** Localización de los ligandos en la membrana luego de que ambos estuvieran estabilizados en ella (15ns).



## **7. Discusión:**

### **7.1. Acoplamiento molecular para la predicción del modo de unión de capsaicina:**

En el caso de no encontrarse en bases de datos un complejo proteína-ligando resuelto por métodos cristalográficos, la primera pregunta que surge al plantear los objetivos es sobre la correcta orientación del ligando en el sitio de unión. Para este propósito, son ampliamente utilizados los programas computacionales de acoplamiento molecular, existiendo una gran gama de ellos que gozan de gran popularidad, como DOCK (Allen, *et al.*, 2015), Autodock (Morris, *et al.*, 2008), Autodock Vina (Trott y Olson, 2009), Glide (Repasky, *et al.*, 2007), GOLD (Nurisso, *et al.*, 2012) o ICM (Neves, *et al.*, 2012), entre otros. Estos programas permiten realizar la búsqueda en el espacio conformacional del ligando para la identificación de la mejor pose de este en la formación del complejo proteína-ligando y permiten además predecir la afinidad del ligando por el receptor, expresado como un valor de energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) teórico (Kitchen, *et al.*, 2004).

Las rutinas de acoplamiento molecular mencionadas han mostrado tener muy buenos resultados frente a distintos desafíos asociados al descubrimiento de nuevas drogas (Chang, *et al.*, 2010; Perryman, *et al.*, 2014; Saha y Verma, 2013), por lo tanto la selección del programa específico a utilizar depende del problema que se quiera resolver. La principal diferencia entre ellos radica en sus estrategias para la búsqueda del espacio conformacional, las que se dividen principalmente en tres categorías: métodos sistemáticos, métodos de simulación y métodos de búsqueda al azar o estocástica (Kitchen, *et al.*, 2004). Los métodos sistemáticos comprenden ciclos de búsqueda iterativos, en donde los grados de libertad de una molécula son secuencialmente explorados dentro de un sitio de unión, acompañados por pasos de minimización de energía entre cada iteración (Kitchen, *et al.*, 2004). Por otro lado, los métodos de simulación consisten en la representación de la formación del complejo mediante dinámica molecular o simulaciones de Monte Carlo (Kitchen, *et al.*, 2004). Por último, los métodos de búsqueda estocástica comprenden la búsqueda del espacio conformacional realizando modificaciones al

azar al ligando o población de ligandos, utilizando simulaciones de Monte Carlo o algoritmos genéticos (Kitchen, *et al.*, 2004). Generalmente, los programas de acoplamiento molecular permiten explorar únicamente el espacio conformacional del ligando, asumiendo un receptor rígido (Kitchen, *et al.*, 2004; Trott y Olson, 2009), mientras que la capacidad de entregar flexibilidad al receptor tiene un alto costo de poder de cómputo adicional (Repasky, *et al.*, 2007). Como consecuencia, el tiempo requerido para la búsqueda tiende a escalar dependiendo del tamaño del set de moléculas a ser evaluado. Este corresponde a un punto relevante del presente trabajo, por lo que el primer criterio de selección corresponde a la relación entre la robustez del método y el costo computacional para la evaluación de bases de datos de miles de moléculas mediante acoplamiento molecular masivo. Otros relevantes a considerar corresponde al hecho de que muchos de los programas de acoplamiento molecular poseen licencias de tipo propietario, implicando el pago de una licencia de valor no despreciable para su uso (como en el caso de GOLD o Glide) y requieren de un gran esfuerzo para su implementación en centros de cómputo avanzados.

Así, considerando estas aristas, se decidió utilizar el software Autodock Vina para el presente trabajo, el que ya se encontraba previamente implementado en nuestro centro de investigación. El programa Autodock Vina corresponde a un método de tipo estocástico, el cual posee implementado un algoritmo de tipo genético Lamarckiano (Trott y Olson, 2009; Morris, *et al.*, 1998), el que integra las nociones de evolución y herencia desarrollada por Lamarck para la búsqueda conformacional (Burkhardt, 2013), considerando cada conformación generada para un ligando determinado como un gen con características estructurales definidas. Estas características corresponden a las coordenadas internas de la molécula dentro del espacio de búsqueda. De este modo, luego de una generación inicial de individuos, cada ciclo iterativo consiste en la introducción de mutaciones al azar para cada individuo, la evaluación de la pose generada mediante la función de puntuación del programa y la cruza al azar entre individuos que se adaptan mejor al ambiente, para la generación de una próxima generación (Morris, *et al.*, 1998). Las ventajas de Autodock Vina comprenden su estatus de programa de licencia libre, de bajo costo en términos de recursos computacionales, el costo de implementación en este caso es nulo y ha mostrado un buen desempeño en la búsqueda de ligandos de buena afinidad para sitios de

unión anfipáticos y de regulación de tipo alostérica (Chang, *et al.*, 2010; Perryman, *et al.*, 2014; Saha y Verma, 2013). Además, Autodock Vina mostró una gran capacidad de manejar de mejor forma las moléculas con gran cantidad de grados de libertad (enlaces rotables) (Morris, *et al.*, 2009; Trott y Olson, 2009), característica deseable al testear una librería de compuestos con una alta variabilidad estructural. Por consecuencia, debido al carácter estocástico del algoritmo y a la gran cantidad de grados de libertad que puede manejar, para obtener la convergencia de la búsqueda, es necesario generar múltiples búsquedas independientes para intentar explorar por completo el espacio conformacional del ligando o una búsqueda lo suficientemente larga para alcanzar este propósito.

Autodock Vina considera el receptor rígido, dándole flexibilidad únicamente al ligando evaluado. Por consecuencia, fue necesario considerar como receptor a aquella estructura del canal TRPV1 que tuviera los residuos relacionados con la sensibilidad a agonistas de tipo vaniloide en una conformación ‘activa’. Puesto que la resolución del canal fue resuelta en la presencia de agonistas, la primera estructura tridimensional del canal en ser considerada fue aquella que fue resuelta en complejo a capsaicina (PDB ID: 3J5R). El espacio de búsqueda fue definido en función del sitio sugerido de unión a compuestos de tipo vaniloide, el que fue definido a través de la interpretación de las evidencias experimentales presentes en la literatura. Estas evidencias plantean que los residuos relevantes para la sensibilidad a compuestos de tipo vaniloides se encuentran en la vecindad de las hélices transmembranales S3 y S4 (Boukalova, *et al.*, 2010; Cao, *et al.*, 2013; Chou, *et al.*, 2004; Gavva, *et al.*, 2004a; Jordt y Julius, 2002; Kym., *et al.*, 2009; Liao, *et al.*, 2013; Susankova, *et al.*, 2007, Winter, *et al.*, 2013). En este punto, las simulaciones de acoplamiento molecular no fueron capaces de localizar el ligando en el sitio definido, entregando las poses encontradas fuera de esta región. Incluso, al restringir más el espacio de muestreo y darle una mayor exhaustividad a la búsqueda conformacional, no fue posible reproducir los resultados del acoplamiento molecular en el mismo sitio donde se encontró la densidad electrónica que se atribuyó a capsaicina (Cao, *et al.*, 2013; Liao, *et al.*, 2013). En su función de puntuación, Autodock Vina presenta un término que evalúa los impedimentos estéricos presentes en cada conformación evaluada, por lo que si el ligando no posee el suficiente espacio para alojarse en el sitio, el algoritmo descartará todas las poses que se originen dentro de

este sitio (Trott y Olson, 2009). Para comprobar esto, se decidió explorar las similitudes estructurales entre los agonistas capsaicina y resiniferatoxina, y utilizar la estructura en la conformación completamente abierta como receptor (PDB ID: 3J5Q), considerando que debido al mayor volumen de resiniferatoxina, el bolsillo de unión estaría más accesible. Se realizaron simulaciones de acoplamiento tanto para capsaicina como para resiniferatoxina con los parámetros por defecto, observándose finalmente la convergencia de los resultados dentro del sitio de unión analizado, con una localización muy similar a las densidades electrónicas encontradas cuando resolvieron el canal (Cao, *et al.*, 2013; Liao, *et al.*, 2013). En la Figura Suplementaria 1 se muestran los resultados del acoplamiento molecular comparados con las densidades electrónicas.

Como se mencionó anteriormente, para intentar superar la estocasticidad del método de docking, se realizaron múltiples simulaciones de acoplamiento molecular de manera independiente. Del mismo modo, de manera paralela, se realizaron simulaciones independientes aumentando el número de iteraciones. En ambos casos se determinó que 50 correspondía a un número razonable de ensayos independientes, para así poder observar una buena distribución de la variabilidad conformacional del ligando. Este método fue utilizado previamente en la identificación del modo de unión de PI(4,5)P<sub>2</sub> en la interface entre subunidades del canal TRPV1 (Poblete, *et al.*, 2015). De manera análoga, el mismo resultado anterior puede ser obtenido con alta reproducibilidad al simular el acoplamiento utilizando 50 iteraciones. Debido a que el resultado de las 50 simulaciones independientes permite una mejor exploración visual de la diversidad conformacional, se decidió continuar con esa ruta para la caracterización del modo de unión de capsaicina.

## 7.2. El modo de unión predicho guarda buena relación con los datos experimentales:

El bolsillo de unión de capsaicina presenta una distribución marcada de las propiedades fisicoquímicas de los residuos que lo componen. Los resultados de las simulaciones de acoplamiento molecular y la evidencia obtenida cuando resolvieron el canal, sugieren que la orientación más probable de capsaicina en el sitio de unión corresponde a CAP<sub>down</sub>, en la cual el

anillo vaniloide del ligando enfrenta al residuo TYR511, mientras que el grupo trans-2-metil-hepteno se orienta sobre la región principalmente hidrofóbica del bolsillo, como se observa en la Figura 11. En esta están presentes residuos de tipo polar sin carga (verde) como THR511 y SER512; además, se puede observar la presencia de GLU570, que corresponde a un residuo con carga negativa (rojo). Por el contrario, en la zona opuesta, se observa una gran presencia de residuos hidrofóbicos (blanco). De manera consecuente, el grupo trans-2-metil-3-hepteno se localiza en el contexto de esta zona hidrofóbica, la que a su vez está altamente expuesta a las ramificaciones insaturadas de la membrana. En esta región, se localizan diversos residuos que participan en la sensibilidad a compuestos vaniloides, a los antagonistas capsazepina e iodo-resiniferatoxina y a la potenciación de las corrientes generadas por la activación del canal dependiente de temperatura (Chou, *et al.*, 2004, Gavva, *et al.*, 2004, Johnson, *et al.*, 2006, Jordt y Julius, 2002, Lee, *et al.*, 2011, Susankova, *et al.*, 2007). Si bien la fisiología asociada a las modificaciones en este segmento se encuentran caracterizadas en cierto detalle, no se conoce el rol que cumple cada uno de los residuos al momento de interactuar con el ligando. Por lo tanto, solo se puede inferir que la presencia del grupo trans-2-metil-3-hepteno en el contexto hidrofóbico del bolsillo de unión a compuestos vaniloides guarda relación con la distribución de las propiedades fisicoquímicas de este.

Las evidencias experimentales que surgen al reemplazar el residuo TYR511 por Alanina (Jordt y Julius, 2002), sugieren la interacción directa entre el anillo vaniloide de capsaicina y el residuo TYR511. Además, en estudios de tipo SAR (Structure-Activity Relationship) para la identificación de posibles nuevos ligandos que interactúen con TRPV1, se determinó que una estructura cíclica insaturada es requerida para la interacción con el canal (Shukla, *et al.*, 2014, Walpole, *et al.*, 1996). De este modo, esta interacción estaría de acuerdo con el modo de unión CAP<sub>down</sub> determinado para capsaicina (Figura 12) en donde el anillo vaniloide generaría un empacamiento de tipo  $\pi$ - $\pi$  con el anillo del residuo TYR511. De manera complementaria, si comparamos la orientación de la cadena lateral del residuo TYR511 en la estructura del canal en su conformación cerrada (PDB ID: 3J5P) con respecto al canal resuelto en complejo con resiniferatoxina (PDB ID: 3J5Q), se puede observar que en el primer caso esta se encuentra en una posición opuesta al sitio (Figura suplementaria 4). Esto puede sugerir tanto que el

movimiento de esta cadena lateral puede ser relevante para la residencia del ligando, como que la interacción del ligando con esta puede ser relevante para la propagación de la señal de activación dependiente de ligando del canal. Puede que esta aseveración no sea del todo correcta, ya que la resolución de la estructura utilizada (3.9Å) no permitió conocer de manera certera la localización de las cadenas laterales. En las simulaciones de dinámica molecular, se puede observar que capsaicina se localiza rápidamente en la interface superior, en una conformación que se asemeja a la observada en la mejor pose de *docking* (Figura 15B). Esta orientación fue corroborada un par de meses después en 2015, donde se relacionó la localización de la cadena lateral del residuo TYR511 con la localización del segmento A del ligando en la membrana (Hanson, *et al.*, 2015).

Si bien la asociación del ligando con el residuo TYR511 es reconocido como el determinante estructural más relevante para la unión de compuestos de tipo vaniloides (Darré y Domene, 2015; Gavva, *et al.*, 2004; Hanson, *et al.*, 2015; Jordt y Julius, 2002; Lee, *et al.*, 2011; Poblete, *et al.*, 2015), al visualizar las interacciones determinadas para la pose de menor energía de capsaicina en la conformación CAP<sub>down</sub>, se puede observar que se relaciona con residuos a los que se les atribuye una gran importancia tanto para la unión de compuestos vaniloides como para la propagación de la señal de activación de TRPV1 dependiente de este tipo de ligandos (Winter, *et al.*, 2013). El residuo THR550 ha sido propuesto como uno de los más relevantes en la función de capsaicina (Gavva, *et al.*, 2004, Jordt y Julius, 2002, Lee, *et al.*, 2011), resiniferatoxina (Chou, *et al.*, 2004) y para el antagonista competitivo capsazepina (Phillips, *et al.*, 2004). De este modo, la posibilidad de interacción mediante un puente de hidrógeno entre THR550 y el grupo N-metilacetamida de capsaicina puede contribuir tanto al anclaje del ligando y su correcta orientación, como a la propagación de la señal de activación dependiente de ligando del canal. Estudios computacionales recientes han propuesto de cierto modo esta relación, sugiriendo la necesidad del ligando de interactuar tanto con TYR511 como con THR550 para ejercer su función (Darré y Domene, 2015, Poblete, *et al.*, 2015, Steinberg, *et al.*, 2014, Walpole, *et al.*, 1996).

El caso de la interacción de capsaicina con GLU570 es algo controversial. Es sabido que este residuo participa en la potenciación mediada por capsaicina de las corrientes generadas por la activación de TRPV1 dependiente de voltaje o temperatura (Boukalova, *et al.*, 2010), lo que

sugiere que el residuo GLU570 sería parte de la ruta alostérica que comunica al menos dos módulos de activación diferentes del canal (Latorre, *et al.*, 2007a). Más aún, se sugirió recientemente que capsaicina estaría energéticamente acoplada a este residuo, lo que reafirma su relevancia (Yang, *et al.*, 2015). Debido a esto, se podría concluir que la interacción mediante puente de hidrógeno de capsaicina con la cadena lateral de este residuo puede actuar como modulador alostérico de ambos módulos de activación, permitiendo a GLU570 actuar como un potenciómetro molecular en TRPV1. El rol controversial surge al comparar otros ligandos conocidos de TRPV1, como por ejemplo a capsazepina o iodo-resiniferatoxina. Ambos ligandos poseen grupos hidroxilo en el grupo homólogo al anillo vaniloide, pero de forma opuesta a capsaicina, ambos actúan como antagonistas del canal (Bevan, *et al.*, 1992, Phillips, *et al.*, 2004, Trevisani, *et al.*, 2004). Más aún, en muchos casos, la adición de un grupo halógeno en el anillo análogo al vaniloide resulta en la pérdida de actividad agonista del canal a un antagonista. Existen determinaciones experimentales entre la relación de cada segmento de capsaicina y los residuos del sitio de unión a compuestos vaniloides del canal. En ellos, se determinó que la zona A del ligando, correspondiente al anillo vaniloide, estaría acoplado energéticamente al residuo GLU570. Por otro lado, la estructura B de capsaicina estaría energéticamente acoplada a el residuo THR550 (Yang, *et al.*, 2014). Si bien esto guarda relación con el modelo de interacciones relevantes desarrollado para capsaicina en el presente trabajo, el rol de la estructura C no está muy claro, no encontrándose asociación energética con ningún residuo en particular del sitio. Finalmente, es necesaria una mayor validación tanto por métodos teóricos como experimentales para identificar el rol del residuo GLU570 en la activación del canal y en la comunicación de los distintos módulos de activación de este, además de conocer el rol de la zona C del ligando en la activación dependiente de ligando del canal del canal TRPV1.

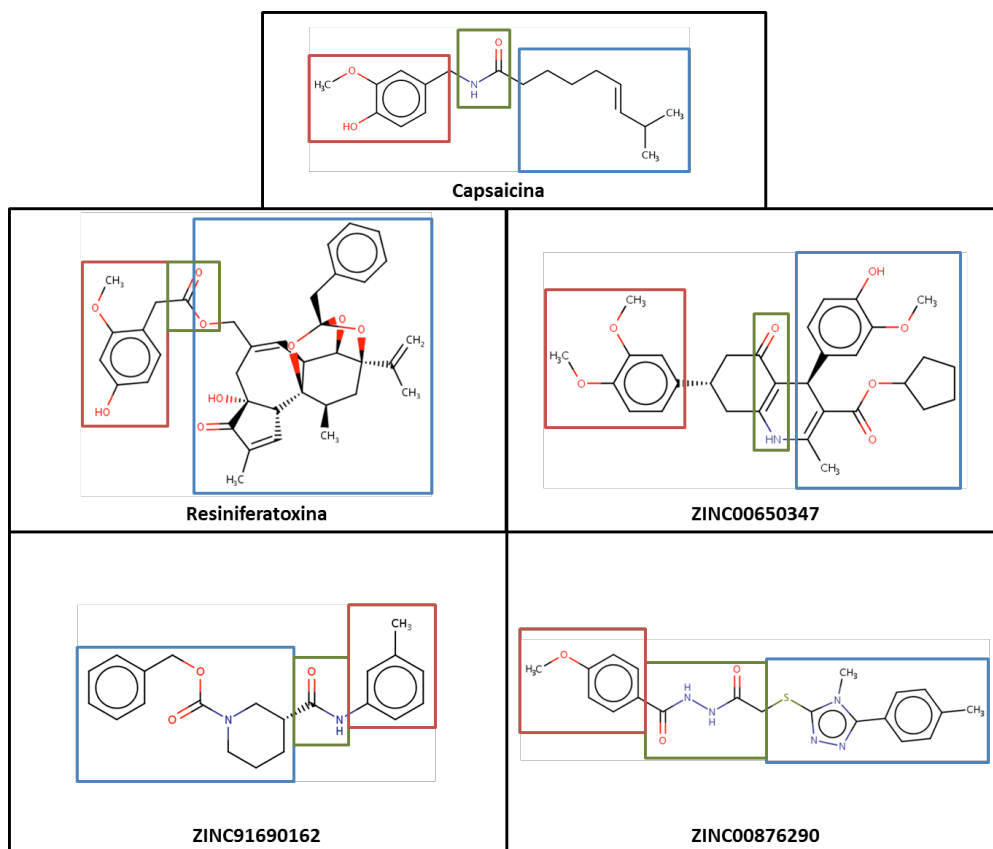
### 7.3. Correlación entre las estructuras de los compuestos líderes y el modelo de farmacóforo de capsaicina:

Mediante estrategias de modificación química, se determinó que capsaicina presenta en su estructura tres regiones definidas a las cuales se les atribuyó distintos niveles de relevancia en

función de su relación estructura-actividad (*Structure-Activity Relationship*, SAR), como se observa en la Figura 1 (Walpole, *et al.*, 1996). Al comparar las características estructurales de los ligandos seleccionados como posibles agonistas de TRPV1, con las de capsaicina y resiniferatoxina, se puede inferir la identidad de cada uno de los segmentos para los ligandos seleccionados. En la Figura 16 se observa la relación estructural entre capsaicina, resiniferatoxina y los tres mejores ligandos resultantes de la simulación de acoplamiento molecular masivo, y la subsecuente búsqueda de la hipótesis de farmacóforo.

Como se observa en la Figura 16, se puede reconocer en función de su estructura y el modo de unión de cada ligando visto en la figura 14, los tres segmentos definidos para los agonistas conocidos de TRPV1 que fueron descritos en la literatura y que han sido considerados relevantes para la interacción con el canal (Hanson, *et al.*, 2015, Steinberg, *et al.*, 2014, Walpole, *et al.*, 1996). Como se mencionó anteriormente, se piensa que el segmento A estaría relacionado con el primer paso de unión entre el ligando y el canal TRPV1, mediando el reconocimiento del sitio gracias a su interacción con TYR511 (Hanson, *et al.*, 2015). Las evidencias experimentales sugieren que es necesaria una estructura cíclica insaturada para esto, estructura presente en cada uno de los ligandos que se observan en la Figura 16. Sin embargo, la diferencia entre los sustituyentes de este grupo agrega una mayor controversia al rol de la interacción del ligando con el residuo GLU570, ya que no todos ellos poseen un grupo polar capaz de actuar como donador o aceptor de puentes de hidrógeno. Así, los resultados sugieren que no es un requerimiento la interacción directa con este residuo para el proceso de activación dependiente de ligandos de TRPV1.





**Figura 16.** Comparación estructural entre capsaicina y las moléculas seleccionadas. Se muestran los segmentos A, B y C descritos en la literatura para capsaicina (Walpole, *et al.*, 1996), los que fueron homologados a los ligandos mostrados mediante la comparación de sus modos de unión. Se incluyó a resiniferatoxina con fines comparativos.

La figura muestra además diversidad en el segmento B, demarcado en verde, segmento determinado como relevante para la interacción con el residuo THR550. Esta diversidad sugiere que no es necesaria una estructura canónica para la interacción con TRPV1, si no que le da valor al concepto de bioisosterismo, concepto que indica que los grupos funcionales de un ligando pueden ser descritos en base a la forma en que interactúa con el receptor, lo que contribuye finalmente a su unión y a su actividad intrínseca (Van Drie, 1997). Además, el sitio de unión pareciera restringir el acceso a estructuras muy voluminosas a la región en donde se encuentra el residuo TYR511. De este modo, se puede concluir que esta zona puede actuar como un linker necesario entre los segmentos A y C, debido a la exigente geometría del sitio de unión a

vaniloides. Esto es corroborado por la noción de que la zona B otorga grados de libertad conformacional adicionales, que son requeridos para la interacción con el canal (Walpole, *et al.*, 1996).

Los estudios de modificaciones químicas realizadas sobre capsaicina y resiniferatoxina al segmento C, concluyen que esta sección está asociada a la potencia del agonista (Walpole, *et al.*, 1996). La gran variabilidad de este segmento entre los ligandos evaluados experimentalmente sugiere que no existen grupos funcionales específicos que pudieran explicar la diferencia entre la actividad mostrada. Por otro lado, es sabido que resiniferatoxina tiene una mayor potencia que capsaicina, por lo que el volumen de este segmento puede estar inversamente relacionado con la concentración de agonista necesario para obtener un 50% de la actividad máxima esperada. Esto se puede corroborar con el hecho de que el Ligando 074575 (ZINC00650347) posee la mayor actividad de los tres ligandos seleccionados y a su vez posee la una zona C más voluminosa de los ligandos seleccionados. Este segmento además pareciera estar muy relacionado con la hidrofobicidad del ligando, por lo que se abre la pregunta de si la actividad del ligando tiene relación con su hidrofobicidad.

#### 7.4. Los ligandos líderes muestran una buena actividad in vitro y se correlaciona con las predicciones in silico:

El estándar para la validación de moduladores de canales iónicos son los registros electrofisiológicos de su actividad (Bezanilla, 2008). En este contexto, las técnicas electrofisiológicas han sido ampliamente utilizadas para determinar la dependencia del potencial de membrana ( $V_m$ ) o de especies químicas como neurotransmisores en la activación de canales dependientes de voltaje y para determinar la dependencia de agonistas en la activación de canales dependiente de ligandos (Guan, *et al.*, 2013). Para este fin es ampliamente utilizada la pinza de voltaje de dos electrodos (TEVC), técnica experimental desarrollada inicialmente por Cole y Marmot en el primer tercio del siglo XX y mejorada por Hodgkin, Huxley y Katz a finales de la década de los 40' para su uso en el axón gigante de calamar (Hodgkin, *et al.*, 1952). El TEVC posee dos electrodos, uno para monitorear el  $V_m$  y el otro para ajustarlo a los valores deseados

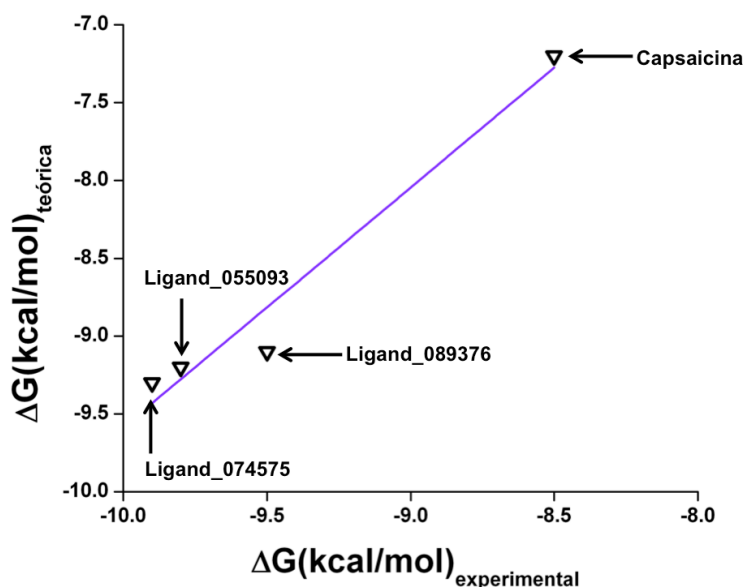
(Guan, *et al.*, 2013). Si bien esta técnica posee aplicaciones para células grandes, siendo implementado en el estudio del axón gigante de calamar o células musculares, mucho del entendimiento mas básico sobre el comportamiento de los canales iónicos se ha obtenido mediante esta aproximación (Guan, *et al.*, 2013, Hodgkin, *et al.*, 1952). Actualmente, gracias a los avances en la biología molecular, es posible expresar de manera heteróloga los canales iónicos de interés para su estudio. Así, los ovocitos de *Xenopus laevis* representan el sistema mayormente utilizado en la aplicación del TEVC en el estudio de canales iónicos debido a su gran tamaño y a la baja expresión de canales y receptores endógenos (Guan, *et al.*, 2013).

Los registros obtenidos mediante TEVC (figura 15), muestran la dependencia de la activación de TRPV1 de rata con respecto a la concentración de compuesto de prueba agregado al medio. Las curvas dosis respuesta revelan que todos los compuestos actúan como agonistas del canal TRPV1, aumentando las corrientes iónicas a través de la membrana semipermeable del ovocito de *Xenopus*. Estos compuestos poseen una actividad media ( $EC_{50}$ ) superior a la de capsaicina, cuyo valor de actividad de referencia encontrado en la literatura para el mismo sistema de expresión heterólogo es de  $\sim 600\mu M$  (Caterina, *et al.*, 1997). Utilizando estos valores de  $EC_{50}$  y que este parámetro equivale a la constante de disociación ( $K_d$ ) debido al modelo utilizado en donde se considera un solo sitio de unión, es posible realizar una correlación entre la energía libre de unión ( $\Delta G_{bind}$ ) determinada de forma teórica y un cálculo de energía libre experimental utilizando la siguiente relación  $\Delta G_{bind} = -RT\ln(K_d)$ , donde R corresponde a la constante de los gases ( $1,987 \text{ cal K}^{-1}\text{mol}^{-1}$ ), T equivale 298K y  $K_d$  corresponden a los valores de  $EC_{50}$  determinados experimentalmente para cada uno de los ligandos seleccionados (Berg, *et al.*, 2002), además del valor reportados en la literatura para capsaicina (Caterina, *et al.*, 1997).

Al realizar una correlación entre los valores de energía teóricos y experimentales mediante regresión lineal (Figura 18), se observa una muy buena correlación entre ambos valores ( $r^2 = 0,9453$ ). Por otro lado, es conocido que las interacciones hidrofóbicas son responsables de gran parte de la energía de unión para un ligando determinado (Schneider y Baringhouse, 2008) y que la pungencia de un compuesto que tenga como blanco biológico a TRPV1 está directamente relacionado con su hidrofobicidad (Ursu, *et al.*, 2010). De este modo es posible comparar la potencia de los ligandos evaluados con la hidrofobicidad predicha para cada uno de ellos, donde

en acuerdo a lo descrito en la literatura, se observa que la hidrofobicidad de los ligandos guarda relación con su valor de  $EC_{50}$ . Esta relación sugiere que el principal determinante de la actividad intrínseca del ligando recae sobre el segmento C, por lo que el segmento A y B pueden estar relacionados mayormente con la unión del ligando al sitio descrito en TRPV1, más allá de ser un determinante de su potencia. Además, la adición de sustituyentes de tipo halógeno (como trifloruro) en este segmento por vías de síntesis química han mostrado ser una estrategia bastante fructífera, probablemente por su momento dipolar similar a un grupo hidrofóbico (Wasik, *et al.*, 2010).

	$\Delta G$ (kcal/mol)	
	Experimental	Teórica
Ligand_074575	-9.9	-9.3
Ligand_055093	-9.8	-9.2
Ligand_089376	-9.5	-9.1
Capsaicina	-8.5	-7.2



**Figura 17.** Relación entre energía libre de unión teórica y experimental. La energía libre experimental se calculó mediante  $\Delta G_{bind} = -RT \ln(K_d)$ , donde R corresponde a la constante universal de los gases,  $T = 298K$  y  $K_d$  corresponde a la constante de disociación determinada de manera experimental ( $K_d = EC_{50}$ ) para cada ligando. La línea recta de color morado corresponde al ajuste lineal de los datos. El coeficiente de correlación de los datos obtenido a partir de una regresión lineal corresponde a  $r^2 = 0.9453$ .

### 7.5. Nuevas perspectivas sobre la farmacología asociada al canal TRPV1:

Desde su identificación en células del DRG de rata y su posterior asociación a la generación de la respuesta dolorosa, la modulación de la actividad del canal TRPV1 por medios

farmacológicos ha generado un creciente interés (Gomtsyan y Faltynek, 2010). Esta modulación ha sido manejada generalmente por la aplicación de agonistas de TRPV1 como capsaicina, existiendo una gran gama disponible en el mercado actualmente. Estos compuestos median la insensibilización del canal luego de aplicaciones sucesivas o de una alta concentración de este, proceso conocido como taquifilaxis (Caterina, *et al.*, 1997; Petersen y LaMotte, 1993; Tominaga, *et al.*, 1998). Por otro lado, el uso de antagonistas ha sido una estrategia mas popular en el tratamiento de modelos de dolor en animales y humanos, apuntando al rápido bloqueo del canal, para así inhibir la generación del impulso nervioso (Gavva *et al.*, 2005b; Rami *et al.*, 2006; Szallasi y Blumberg, 1999). Estas estrategias no han resultado fructíferas debido a la gran cantidad de efectos secundarios producidos en los individuos tratados en fases clínicas, abriendo la necesidad de la identificación de nuevos compuestos para este fin.

Como se mencionó anteriormente, la fisiología del canal TRPV1 se encuentra caracterizada en cierto detalle, además, mediante estudios de mutagénesis dirigida se han logrado identificar algunos de los residuos relevantes para las distintas modalidades de activación, especialmente la activación dependiente de capsaicina (Winter, *et al.*, 2013). Sin embargo, aún falta esclarecer los detalles asociados a la interacción de ligandos con el sitio de unión. La resolución de la estructura del canal mediante criomicroscopía electrónica en su conformación cerrada y en presencia de agonistas (Cao, *et al.*, 2013; Liao, *et al.*, 2013), entregó valiosos detalles estructurales del canal, sugiriendo un mecanismo de apertura (Poblete, *et al.*, 2015); pero debido a la baja resolución, las interacciones relevantes entre el ligando y el sitio no pudieron ser resueltas. La caracterización de los determinantes estructurales en el *gating* del canal presenta un desafío para los entusiastas de la biofísica, pero a su vez presenta un dolor de cabeza para los farmacólogos, teniendo que lidiar con múltiples modalidades de activación a la vez. Este desafío fue abordado mediante la simulación de múltiples acoplamientos moleculares de capsaicina en el sitio de unión a compuestos de tipo vaniloide sugerido y se logró determinar que la orientación más probable del ligando corresponde a una orientación '*tail up and head down*', en donde el anillo del ligando enfrenta al residuo TYR511, generándose una interacción de tipo  $\pi$ - $\pi$  entre ellos. Esta interacción fue testada mas allá mediante métodos cuánticos, donde se determinó que un empacamiento en forma de T o *t-shaped  $\pi$ - $\pi$  interaction*, sería las mas favorable

energéticamente, permitiendo el acoplamiento del grupo hidroxilo del residuo TYR511 con el oxígeno de la región B de capsaicina (Figura suplementaria 5). Se determinó además un acoplamiento mediante puente de hidrógeno entre el hidroxilo de la región A del ligando con el residuo GLU570 del sitio y del nitrógeno de la región B con el residuo THR550, guardando relación con los estudios de mutagénesis dirigida (Winter, *et al*, 2013). Por último, además, se observó una relación entre la hidrofobicidad del ligando y su potencia, atribuyéndose a la presencia de una región C mas voluminosa.

Si bien el mecanismo por el cual la señal de activación viaja desde el sitio de unión a ligandos de tipo vaniloide hasta la compuerta inferior se encuentra muy lejos de ser dilucidado, los resultados obtenidos en el presente trabajo presentaron nueva evidencia que aporta con piezas importantes para describir el mecanismo. Gracias a la complementación de estos antecedentes a través los resultados obtenidos por otros grupos de investigación, se ha logrado el desarrollo de una publicación científica (adjunta) que aborda la activación del canal TRPV1 dependiente no solo de ligandos de tipo vaniloide, si no que de toxinas peptídicas y lípidos (Diaz-Franulic, *et al.*, 2016), en donde se revisa la información disponible hasta la fecha asociada a estos mecanismos de activación. Así, el presente trabajo cumple el objetivo de ciencia aplicada, desarrollando un método efectivo de búsqueda de nuevas moléculas que modulen la actividad del canal TRPV1, así como el desafío de ciencia básica planteado, contribuyendo al conocimiento del mecanismo de activación dependiente de ligandos del canal.

## **8. Conclusiones:**

Las conclusiones obtenidas a partir del presente trabajo se presentan a continuación:

**I.** Mediante el diseño y la estandarización de un protocolo computacional de búsqueda de moléculas con gran afinidad por un receptor de interés (en este caso el canal iónico TRPV1), a través de un protocolo de acoplamiento molecular masivo, es posible obtener una población de miles de integrantes que presenten una gran afinidad por el receptor. En el caso de canales iónicos dependientes de ligando, estas moléculas pueden actuar como moduladores de la actividad de su blanco biológico. Esto último no es posible extrapolar desde los experimentos computacionales únicamente.

**II.** El uso de una molécula de referencia y mediante la implementación de descriptores adicionales, como la hidrofobicidad o la capacidad de satisfacer el modo de unión de la molécula de referencia, permite enriquecer la búsqueda con moléculas que potencialmente puedan ser activos contra el blanco biológico de interés. En este contexto es necesaria una extensiva revisión de los resultados, contrastando con la información disponible en la literatura.

**III.** Para poder confirmar las predicciones computacionales, es necesario contar con una plataforma de comprobación experimental robusta. En este caso, la determinación de la actividad de TRPV1 expresado de forma heteróloga en ovocitos de *Xenopus*, permitió la validación de los ligandos seleccionados como análogos mas potentes que capsaicina.

**IV.** Finalmente, fue posible discriminar tres moléculas que finalmente resultaron ser compuestos activos contra el canal TRPV1 de una población de cientos de miles. Los resultados del presente trabajo reafirman las ventajas de realizar búsquedas computacionales en apoyo a las estrategias de descubrimiento de fármacos, disminuyendo el tiempo requerido para el descubrimiento de nuevos hits y el costo asociado al proceso.

**V.** Mediante la caracterización del modo de unión de capsaicina y la identificación de agonistas más potentes del canal TRPV1 análogos a esta molécula, se logró establecer cierta correlación entre los datos experimentales asociados a mutaciones del sitio de unión y la sensibilidad a compuestos vaniloides, contribuyendo así al entendimiento de la farmacología del canal.

**VI.** Como proyección, este trabajo posee el desafío de intentar caracterizar los cambios estructurales que median el *gating* del canal e intentar revelar el como esta modalidad de activación se relaciona con las otras vías de manera alostérica. Conociendo esto, será posible generar compuestos que bloqueen de manera selectiva una sola modalidad de activación, evitando así efectos secundarios indeseados como la hipertermia.



## **9. Bibliografia:**

Adcock, J. (2009). TRPV1 receptors in sensitisation of cough and pain reflexes . Pulmonary Pharmacology & Therapeutics, 22(2):65–70.

Agnew, W., Levinson, S., Brabson, J., Raftery, M. (1978). Purification of the tetrodotoxin-binding component associated with the voltage-sensitive sodium channel from *Electrophorus electricus* electroplax membranes. Proc. Nati. Acad. Sci. USA, 75(6):2606-2610.

Allen, W., Balias, T., Mukherjee, S., Brozell, S., Moustakas, D., Lang, PT., Case, DA., Kuntz, I., Rizzo, RC. (2015) DOCK 6: Impact of New Features and Current Docking Performance. J. of Comp. Chem., 36(15):1132-1156.

Allena, M. P. (2004). Introduction to molecular dynamics simulation. En: Computational soft matter: from synthetic polymers to proteins. En: Norbert Attig, Kurt Binder, Helmut Grubmüller, Kurt Kremer (eds)., NIC Series, vol 23, 117-182, John von Neumann Institute for Computing, Jülich.

Andreev, A., Kozlov, S., Korolkova, Y., Dyachenko, I., Bondarenko, D., Skobtsov, D., Murashev, A., Kotova, P., Rogachevskaja, O., Kabanova, N., Kolesnikov, S., Grishin, E. (2013). Polypeptide Modulators of TRPV1 Produce Analgesia without Hyperthermia . Mar. Drugs, 11:5100-5115.

Arias-Darraz, L., Cabezas, D., Colenso, CK., Alegría-Arcos, M., Bravo-Moraga, F., Varas-Concha, I., Almonacid, DE., Madrid, R., Brauchia, S. (2015). A Transient Receptor Potential Ion Channel in *Chlamydomonas* Shares Key Features with Sensory Transduction-Associated TRP Channels in Mammals . The Plant Cell, 27(1):177-188.

Baez-Nieto, D., Castillo, JP., Dragicevic, C., Alvarez, O., Latorre, R.. (2011). Thermo-TRP

channels: biophysics of polymodal receptors. *Adv Exp Med Biol.*, 704:469-90

Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 139:267-284

Basbaum A, Jessell T. (2000) The perception of pain. En: *Principles of Neural Science*. 4<sup>th</sup> Ed.: Capítulo 24. McGraw-Hill, Health Professions Division, New York.

Berg, JM., Tymoczko, JL., Stryer, L. (2002). En: *Biochemistry*, 5th edition. W H Freeman New York. Chapter 9.

Bernèche, S. and Roux, B. (2000). Molecular Dynamics of the KcsA K<sup>+</sup> channel in a bilayer membrane. *Biophysical Journal*, 78:2900-2917

Berman HM., Kleywegt GJ., Nakamura H., Markley JL. (2014). The Protein Data Bank archive as an open data resource. *J Comput Aided Mol Des.*, 28(10):1009-1014.

Best, R., Zhu, X. Shim, J., Lopes, P., Mittal, J., Feig, M., MacKerell, A. (2012). Optimization of the Additive CHARMM All-Atom Protein Force Field Targeting Improved Sampling of the Backbone  $\phi$ ,  $\psi$  and Side-Chain  $\chi_1$  and  $\chi_2$  Dihedral Angles . *J. Of Chem. Theory and Comp.* 8(9):3257-3273.

Bevan, IS., Hothi, S., Hughes, G., James, IF., Rang, HP., Shah,K., Walpole, C., Yeats, JC. (1992). Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin . *Br. J. Pharmacol.*,107:544-552

Bezánilla, F. (2008). Ion channels: From conductance to structure. *Neuron*, 60:456-468

Bourinet, E. , Altier, C, . Hildebrand, M., Trang, T., Salter, M., Zamponi, G. (2014). Calcium-

permeable ion channels in pain signaling. *Physiol. Rev.* 94:81–140.

Boukalova, S., Marsakova, L., Teisinger, J., Vlachova, V. (2010). Conserved residues within the putative S4-S5 region serve distinct functions among thermosensitive vanilloid transient receptor potential (TRPV) channels. *J. Biol. Chem.*, 285:41455-41462.

Brauchi, S., Orta, G., Mascayano, C., Salazar, M., Raddatz, N., Urbina, H., Rosenmann, E., Gonzalez-Nilo, F., Latorre, R. (2007). Dissection of the components for PIP2 activation and thermosensation in TRP channels. *PNAS*, 104(24):10246-10251.

Brederson, JD., Kyma, P., Szallasi, A. (2013). Targeting TRP channels for pain relief. *Eur. J. of Pharm.*, 716(1-3):61–76

Brito, R., Sheth, S., Mukherjea, D., Rybak, L. P., Ramkumar, V. (2014). TRPV1: A potential drug target for treating various diseases. *Cells*, 3:517-545

Brooks, B. R., Brooks, III, C. L., MacKerell, Jr., A. D., Nilsson, L., Petrella, R. J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., Caflisch, A., Caves, L., Cui, Q., Dinner, A. R., Feig, M., Fischer, S., Gao, J., Hodoscek, M., Im, W., Kuczera, K., Lazaridis, T., Ma, J., Ovchinnikov, V., Paci, E., Pastor, R. W., Post, C. B., Pu, J. Z., Schaefer, M., Tidor, B., Venable, R. M., Woodcock, H. L., Wu, X., Yang, W., York, D. M., Karplus, M. (2009). CHARMM: The Biomolecular Simulation Program. *J. Comput. Chem.*, 30(10):1545-1614

Burke, R. E. (2007). Sir Charles Sherrington's The integrative action of the nervous system: a centenary appreciation. *Brain*, 130:887-894

Burkhardt, RW. (2013). Lamarck, evolution, and the inheritance of acquired characters. *Genetics*, 194(4):793-805.

- Burges, PR. and Perl, ER. (1967). Perlmyelinated afferent fibre respondin specifically to noxious stimulation of the skin. *J. Physiol.*, 190:541-562
- Cao, E., Cordero-Morales, J. F., Liu, B., Qin, F., Julius, D. (2013). TRPV1 channels are intrinsically heat sensitive and negatively regulated by phosphoinositide lipids. *Neuron*, 77(4):667-679
- Cao, E., Liao, M., Cheng, Y., Julius, D. (2013). TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature*, 504:113-118
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389:816-824
- Chang, M., Ayeni, C., Breuer, S., Torbett, B. (2010). Virtual Screening for HIV Protease Inhibitors: A Comparison of AutoDock 4 and Vina . *PLoS ONE*, 5(8):1-9.
- Choe, S.(2002). Potassium channel structures. *Nat Rev Neurosci.*, 3(2):115-21.
- Chou, M. Z., Mtui, T., Gao, Y., Kohler, M., Middleton, R. E. (2004) Resiniferatoxin binds to the capsaicin receptor (TRPV1) near the extracellular side of the S4 transmembrane domain. *Biochemistry*, 43, 2501-2511.
- Clapham, D., Montell, C., Schultz, G., Julius, D. (2002). The TRP Ion Channel Family. *IUPHAR Compendium*, TRP Channels.
- Cortright DN., Krause JE., Broom DC. (2007). TRP channels and pain. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1772(8):978-88
- Cosens DJ, Manning A. (1969). Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature*, 224(5216):285-7.

Crombie, I., Davies, H., Macrae, W. (1998). Cut and thrust: antecedent surgery and trauma among patients attending a chronic pain clinic . *Pain*, 76:167–171

Cui, M., Honore, P., Zhong, C., Gauvin, D., Mikusa, J., Hernandez, G., Chandran, P., Gomtsyan, A., Brown, B., Bayburt, E., Marsh, K., Bianchi, B., McDonald, H., Niforatos, W., Neelands, T., Moreland, R., Decker, M., Lee, CH., Sullivan, JP., Faltynek, C. (2006). TRPV1 Receptors in the CNS Play a Key Role in Broad-Spectrum Analgesia of TRPV1 Antagonists . *J. of Neur.*, 26(37):9385–9393

Cummings, M. D., DesJarlais, R. L., Gibbs, A. C., Mohan, V., Jaeger, E. P. (2005). Comparison of automated docking programs as virtual screening tools. *J. Med. Chem.*, 48:962-976

Davies, H., Crombie, I., Macrae, W. (1998) Where does it hurt? Describing locations of chronic pain the body . *Eur. J. of Pain*, 2(1): 69-80

Dhaka, A., Uzzell, V., Dubin, A. E., Mathur, J., Petrus, M., Bandell, M., Patapoutian, A. (2006). TRPV1 is activated by both acidic and basic pH. *The Journal of Neuroscience*, 29(1):153-158

Di Marzo, V., Blumberg, P., Szallasi, A. (2002). Endovanilloid signaling in pain. *Curr. Op. in Neur.*, 12(4):372-379.

Darré, L. and Domene, C. (2015). Binding of capsaicin to the TRPV1 ion channel. *Mol. Pharm.*, 12(12):4454-4465.

Diaz-Franulic, I., Caceres-Molina, J., Sepulveda, RV., Gonzalez-Nilo, F., Latorre, R. (2016). Structure Driven Pharmacology of Transient Receptor Potential Channel Vanilloid 1 (TRPV1). *Mol. Pharm.* [En Revisión]

Djoughri L, Bleazard L, Lawson SN. (1998) Association of somatic action potential shape with sensory receptive properties in guinea-pig dorsal root ganglion neurones. *J Physiol.*, 513(3):857-72.

Ekins, S., Waller, C. L., Swaan, P. W., Cruciani, G., Wrighton, S. A., Wikel, J. H. (2001). Progress in predicting human ADME parameters in silico. *J. of Pharm. And Toxic. Methods*, 44:251-272.

Feller, SE., Zhang, Y., Pastor, RW., Brooks, BR. (1995). Constant pressure molecular dynamics simulation: the Langevin piston method. *J. Chem. Phys.* 103:4613.

Gavva, N., Klionsky, L., Qu, Y., Shi, L., Tamir, R., Edenson, S., Zhang, TJ., Viswanadhan, V., Toth, A., Pearce, L., Vanderah, T., Porreca, F., Blumberg, P., Lile, J., Sun, Y., Wild, K., Louis, JC., Treanor, J. (2004a). Molecular Determinants of Vanilloid Sensitivity in TRPV1. *J. Biol. Chem.*, 279:20283-20295.

Gavva, N., Tamir, R., Qu, Y., Klionsky, L., Zhang, T., Immke, D., Wang, J., Zhu, D., Vanderah, T., Porreca, F., Doherty, E., Norman, M., Wild, K., Bannon, A., Louis, JC., Treanor, J. (2004b). AMG 9810 [(E)-3-(4-t-Butylphenyl)-N-(2,3-dihydrobenzo[b][1,4] dioxin-6-yl)acrylamide], a Novel Vanilloid Receptor 1 (TRPV1) Antagonist with Antihyperalgesic Properties. *J. of Pharm. and Exp. Ther.*, 313(1):474-484.

Gavva, N., Treanor, J., Garami, A., Fang, L., Surapaneni, S., Akrami, A., Alvarez, F., Bake, A., Darling, M., Gore, A., Jang, G., Kesslak, J., Ni, L., Normang, M., Palluconi, G., Rose, M., Salfi, M., Tanf, E., Romanovsky, A., Banfield, C., Davar, G. (2008). Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. *Pain*, 136 (1-2)202–210

Ghilardi JR, Röhrich H, Lindsay TH, Sevcik MA, Schwei MJ, Kubota K, Halvorson KG, Poblete J, Chaplan SR, Dubin AE, Carruthers NI, Swanson D, Kuskowski M, Flores CM, Julius D,

Mantyh PW. (2005). Selective blockade of the capsaicin receptor TRPV1 attenuates bone cancer pain. *J Neurosci.*, 25(12):3126-31.

Gomtsyan, A. and Faltynek, CR. (2010). En: *Vanilloid Receptor TRPV1 in Drug Discovery: Targeting Pain and Other Pathological Disorders*. Wiley-Blackwell.

Gregorio-Teruel, L., Valente, P., Liu, B., Fernandez-Ballester, G., Qin, F. (2015) The Integrity of the TRP Domain Is Pivotal for Correct TRPV1 Channel Gating. *Biophys. J.* 109(3):529–541.

Guan, B., Chen,X., Zhang, H. (2013). Two-Electrode Voltage Clamp. *Methods Mol Biol.*, 998:79-89

Gumbart, J., Khalili-Araghi, F., Sotomayor, M., Roux, B. (2011). Constant field simulations of the membrane potential illustrated with simple systems. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1818(2):294-302

Hanson, SM., Newstead, S., Swartz, KJ., Sansom, M. (2015). Capsaicin Interaction with TRPV1 Channels in a Lipid Bilayer: Molecular Dynamics Simulation . *Biophys. J.*, 108(6) 1425–1434.

Hazan, A., Kumar, R., Matzner, H., Priel, A. (2015). The pain receptor TRPV1 displays agonist-dependent activation stoichiometry. *Sci Rep.*, 5:12278

Holzer, P. (2008). The pharmacological challenge to tame the transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) nocisensor. *Br J Pharmacol.*, 155(8):1145-62.

Holzer, P. and Izzo, A. (2014). The pharmacology of TRP channels. *Brit. J. of Pharm.*, 171(10):2469–2473.

Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. J. Mol. Graph., 14(1):33-38

Hünenberger, PH. (2005) Thermostat Algorithms for Molecular Dynamics Simulations . Adv. Polym. Sci. 173:105–149.

Hodgkin, AL., Huxley, AF., Katz, B. (1952). Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axón of Loligo. J. of Physiol., 116:424-448.

Immke, D. and Gavva, N. (2006). The TRPV1 receptor and nociception. Sem. in Cell & Dev. Bio., 17:582–591

Irwin, J. J. And Shoichet, B. K. (2005). ZINC – A free database of commercially available compounds for virtual screening. J. Chem. Inf. Model., 1:177-182

Ivanova, B. and Spiteller, M. (2014). Evodiamine and rutaecarpine alkaloids as highly selective transient receptor potential vanilloid 1 agonists . Int. J. of Bio. Macro., 65:314–324

Jensen, M. Ø., Jogini, V., Borhani, D. W., Leffler, A. E., Dror, R. O., Shaw, D. E. (2012). Mechanism of Voltage Gating in Potassium Channels. Science, 336:229-233

Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, BT., MacKinnon, R. (2002). Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel . Nature, 417(6888):515-522.

Johnson, D., Garrett, E., Rutter, R., Bonnert, T., Gao, YD., Middleton, RE., Sutton, K. (2006). Functional Mapping of the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Intracellular Binding Site . Mol. Pharm. 70(3):1005-1012.

Jorgensen, W., Chandrasekhar, J., Madura, J., Impey, R., Klein, M. (1983). Comparison of



simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* 79, 926-935.

Julius, D. and Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413:203-210

Julius, D. (2013). TRP Channels and Pain . *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 29:355-384.

Kang, D., Kima, Y., Lima, K., Kima, M., Pearce, L., Pavlyukovets, V., Tao, A., Lang-Kuhs, K., Blumberg, P., Lee, J. (2010). Halogenation of 4-hydroxy/amino-3-methoxyphenyl acetamide TRPV1 agonists showed enhanced antagonism to capsaicin. *Bio. & Med. Chem.*, 18(22):8092–8105

Kitchen, D., Decornez, H., Furr, J., Bajorath, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Rev, Drug Discov.*, 3(11):935-949.

Klebe, G. (2006). Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. *Drug Discov. Today*, 11(13-14):580-94.

Knotkova, H., Pappagallo, M., Szallasi, A. (2008). Capsaicin (TRPV1 Agonist) therapy for pain relief: farewell or revival?. *Clin J Pain*. Feb;24(2):142-54.

Kujawski, J., Popielarska, H., Myka, A., Drabińska, B., Bernard, M. (2012) The log P Parameter as a Molecular Descriptor in the Computer-aided Drug Design – an Overview. *Comp. Meth. In Sci. And Tech.*, 18(2):81-88

Kym, P. R., Kort, M. E., Hutchins, C. W. (2009). Analgesic potential of TRPV1 antagonists. *Biochem. Pharm.*, 78:211-216

LaMotte, R.H., Simone, D.A., Baumann, T.K., Shain, C.N., Alreja, M. (1988). Hypothesis for

novel classes of chemoreceptors mediating chemogenic pain and itch. En: Pain Research and Clinical Management, Elsevier, Amsterdam, pp. 529-535.

Latorre R., Brauchi S., Orta G., Zaelzer C., Vargas G. (2007a). ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating. *Cell Calcium*, 42(4-5):427-38

Latorre R, Vargas G, Orta G, Brauchi S. (2007b). Voltage and Temperature Gating of ThermoTRP Channels. En: TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades. . Chapter 21. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL).

Latorre R., Zaelzer C., Brauchi S. (2009). Structure-functional intimacies of transient receptor potential channels. *Q. Rev. Biophys.* 42(3):201-46

Leach, A. (2001). En: Molecular Modelling: Principles and Applications. 2<sup>nd</sup> Ed. Pearson.

Leeson, P. D. and Springthorpe, B. (2007). The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. *Nature*, 6:881-890.

Levine, D. (2007) .Sherrington's "The Integrative action of the nervous system": A centennial appraisal . *J. of the Neur. Sci.*, 253:1–6

Levy, MN., Berne, RM., Koeppen, BM., Stanton, BA. (2006). En: Berne & Levy Principles of Physiology. 4<sup>th</sup> Ed. Elsevier Mosby.

Liao, M., Cao, E., Julius, D., Cheng, Y. (2013). Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature*, 504:107-112

Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J. (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and

development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1-3):3-26

Lipinski, C. A. (2004). Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*, 1(4):337-341.

Lombardino, J. And Lowe III, J. (2004). The role of the medicinal chemist in drug discovery—then and now. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 3(10):853-862.

Malek, N., Pajak, A., Kolosowska, N., Kucharczyk, M., Starowicz, K. (2015) The importance of TRPV1-sensitisation factors for the development of neuropathic pain . *Mol. and Cell. Neur.*, 65:1–10.

Martyna, G., Tobias, D., Klein, M. (1994). Constant pressure molecular dynamics algorithms, *J. of Chem. Phys.*, 101(5):4177–4189,1994.

McInnes, C. (2007). Virtual screening strategies in drug discovery. *Curr. Op. in Chem. Bio.*, 11:494-502.

Milne, J., Borgnia, M., Bartesaghi, A., Tran, E., Earl, L., Schauder, D., Lengyel, J., Pierson, J., Patwardhan, A., Subramaniam, S. (2013). Cryo-electron microscopy: A primer for the non-microscopist . *FEBS J.*, 280(1):28–45.

Miño, G., Baez, M., Gutierrez, G. (2013). Effect of mutation at the interface of Trp-repressor dimeric protein: a steered molecular dynamics simulation. *Eur. Biophys. J.*, 42(9):683-690

Mitchell, K., Lebovitz, E., Keller, J., Mannesa, A., Nemenov, M., Iadarola, M. (2014) Nociception and inflammatory hyperalgesia evaluated in rodents using infrared laser stimulation after Trpv1 gene knockout or resiniferatoxin lesion . *Pain*, 155(4):733-45.

Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T., Peters, J. A. (2007). Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol. Rev.*, 87(1):165-217.

Morris, GM., Huey, R., Olson AJ. (2008). Using AutoDock for ligand-receptor docking. *Curr. Protoc. Bioinformatics*. Chapter 8.

Morris, GM., Goodsell, D., Halliday, R., Huey, R., Hart, W., Belew, A., Olson, AJ. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. of Comp.Chem.*, 19(14):1639–1662.

Neves, MA., Totrov, M., Abagyan, R. (2012). Docking and scoring with ICM: the benchmarking results and strategies for improvement. *J Comput Aided Mol Des.*, (6):675-86.

Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosato, M., Kikuyotani, S., Hirose, T., Asai, M., Takashima, H., Inayama, S., Miyata, T., and Numa, S. (1983). Primary structures of beta- and delta-subunit precursors of Torpedo californica acetyl-choline receptor deduced from cDNA sequences. *Nature*, 301: 251–255.

Nurisso, A., Bravo, J., Carrupt, PA., Daina, A. (2012). Molecular Docking Using the Molecular Lipophilicity Potential as Hydrophobic Descriptor: Impact on GOLD Docking Performance . *J. of Chem. Inf. and Mod.*, 52(5):1319-1327.

Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.*, 30(16):2785-2791

Okimoto, N., Futatsugi, N., Fuji, H., Suenagal, A., Morimoto, G., Yanai, R., Ohno, Y., Narumi, T., Taiji, M. (2009) High-Performance Drug Discovery: Computational Screening by Combining Docking and Molecular Dynamics Simulations . *PLoS Comp. Biol.*, 5(10):

O'Boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T., Hutchison, G. R. (2011). Open Babel: An open chemical toolbox. *J. Cheminf.*, 3:33

Painter, T., Kaszas, K., Gross, J., Douglas, J., Daye, V., Iadarola, M., Santini, C. (2014) Constrained TRPV1 agonists synthesized via silver-mediated intramolecular azo-methine ylide cycloaddition of  $\alpha$ -iminoamides. *Bio. & Med. Chem. Let.*, 24:963–968 Contents

Palazzo, E., Rossi, F., Maione, S. (2008). Role of TRPV1 receptors in descending modulation of pain. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 286(1-2 Suppl 1):S79-S83

Peppin, J. F. and Pappagallo, M. (2014). Capsaicinoids in the treatment of neuropathic pain: a review. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* 7(1):22-32

Perryman, A. L., Santiago, D. N., Forli, S., Santos-Martins, D., Olson, A. J. (2014). Virtual screening with AutoDock Vina and the common pharmacophore engine of a low diversity library of fragments and hits against the three allosteric sites of HIV integrase: participation in the SAMPL4 protein-ligand binding challenge. *J. Comp. Aided Mol. Des.*, 28(4):429-441

Petersen, M. and LaMotte, R. H. (1993). Effect of protons on the inward current evoked by capsaicin in isolate dorsal root ganglion cells. *Pain*, 54:37-42

Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kalé, L., Schulten, K. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. of Comp. Chem.*, 26(16):1781-1802

Phillips, E., Reeve, A., Bevan, S., McIntyre, P. (2004). Identification of Species-specific Determinants of the Action of the Antagonist Capsazepine and the Agonist PPAHV on TRPV1. *Biol. Chem.*, 279:17165-17172.

Planells-Cases, R., Garcia-Sanz, N., Morenilla-Palao, C., Ferrer-Montiel A. (2005) . Functional aspects and mechanisms of TRPV1 involvement in neurogenic inflammation that leads to thermal hyperalgesia . Eur. J. Physiol., 451(1):151–159.

Poblete , H., Oyarzun, I., Olivero, P., Comer, J. , Zuñiga, M., Sepulveda, RV. , Baez-Nieto , D., Gonzalez, C., Gonzalez-Nilo, D., Latorre, R. (2015). Molecular Determinants of Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) Binding to Transient Receptor Potential V1 (TRPV1) Channels. The J. of Biol. Chem., 290(4):2086–2098.

Pozek, J., Beausang, D., Baratta, J., Viscusi, E. (2016). The Acute to Chronic Pain Transition Can Chronic Pain Be Prevented?. Med. Clin. N. Am., 100:17–30.

Rami, HK., Thompson, M., Stemp, G, Fell, S., Jerman, JC., Stevens, AJ., Smart, D., Sargent, B., Sanderson, D., Randall, AD., Gunthorpe, MJ., Davis, JB. (2006). Discovery of SB-705498: a potent, selective and orally bioavailable TRPV1 antagonist suitable for clinical development. Bioorg Med Chem Lett., 16(12):3287-91.

Redl, G. and Berkoff, C. E. (1974). Quantitative drug design. Chem. Soc. Rev., 3:273-292

Repasky, M., Shelley, M., Friesner, R. (2007). Flexible ligand docking with Glide. En: Current Protocols In Bioinformatics. Chapter 8.

Robertson, M. J., Tirado-Rives, J., Jorgensen, W. L. (2015). Improved Peptide and Protein Torsional Energetics with the OPLS-AA Force Field. J. Chem. Theory Comput. 2015, 11, 3499-3509

Rojas, E. And Luxoro, M. (1963). Micro-injection of trypsin into axons of squid. Nature, 199:78-79.

Ryu, H., Seo, S., Kima, M., Kima, MY., Kima, H., Anna, J., Tran, PT., Hoanga, VH., Byunb, J.,

Cui, M., Son, K., Sharmab, PK., Choi, S., Blumberg, P., Frank-Foltyn, R., Bahrenberg, G., Koegel, BY., Christoph, T., Frommann, S., Lee, J. (2014). 2-Aryl substituted pyridine C-region analogues of 2-(3-fluoro-4-methylsulfonylaminophenyl)propanamides as highly potent TRPV1 antagonists . *Bio. & Med. Chem. Let.*, 24:4044–4047.

Sanner, M. F. (1999). Python: A Programming Language for Software Integration and Development. *J. Mol. Graphics Mod.*, 17:57-61

Saha, S. And Verma, V. (2013). In Silico analysis of Escherichia coli polyphosphate kinase (PPK) as a novel antimicrobial drug target and its high throughput virtual screening against PubChem. 9(10):518-523.

Sahner, J. H., Brengel, C., Storz, M. P., Groh, M., Plaza, A., Müller, R., Hartmann, R. W. (2013) Combining in silico and biophysical methods for the development of Pseudomonas aeruginosa quorum sensing inhibitors # An alternative approach for structure-based drug design. *J. Med. Chem.*, 56(21):8656-8664

Saier Jr., M., Reddy, V., Tamang, D., Västermark, A. (2014). The Transporter Classification Database. *Nucleic Acids Research*, (42):251-258.

Seeliger, D. and de Groot, B. L. (2010). Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock Vina. *J. Comput. Aid. Mol. Des.*, 24:417-422

Shukla, A., Sharma, P., Prakash, O., Singh, M., Kalani, K., Khan, F., Bawankule, D., Luqman, S., Srivastava, SK. (2014). QSAR and Docking Studies on Capsazepine Derivatives for Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Activity. *PLoS ONE*, 9(7).

Simonic-Kocijan, S., Zhao, X., Liu, W., Wu, Y., Uhac, I., Wang, K. (2013). TRPV1 channel-mediated bilateral allodynia induced by unilateral masseter muscle inflammation in rats.

Molecular, 9:68.

Sinnokrot MO., Valeev EF., Sherrill CD. (2002). Estimates of the ab initio limit for pi-pi interactions: the benzene dimer. J Am Chem Soc., 124(36):10887-10893

Sousa, S. F., Fernandes, P. A., Ramos, M. J. (2006). Protein-ligand docking: current status and future challenges. Proteins, 65(1):15-26

Spicarova, D., Nerandzic, V., Palecek, J. (2014). Update on the Role of Spinal Cord TRPV1 Receptors in Pain Modulation. Physiol. Res., 63(Suppl.1):S225-S236

Steinberg, X., Lespay-Rebolledo, C., Brauchi, S. (2014). A structural view of ligand-dependent activation in thermoTRP channels. Front. Physiol., 5:171

Susankova,K., Ettrich, R., Vyklicky, L., Teisinger, J., Vlachova, V. (2007). Contribution of the Putative Inner-Pore Region to the Gating of the Transient Receptor Potential Vanilloid Subtype 1 Channel (TRPV1). J. of Neur., 27(28):7578–7585

Szallasi, A. and Blumberg, P. (1996). Vanilloid receptors: new insights enhance potential as a therapeutic target. Pain, 68(2-3):195–208

Szallasi,A. and Blumberg, P. (1999). Vanilloid (Capsaicin) Receptors and Mechanisms. Phram. Rev., 51(2):159-212.

Szallasi, A., Cruz, F., Geppetti, P. (2006). TRPV1: a therapeutic target for novel analgesic drugs?. Tr. in Mol. Med., 12(11):545-554.

Szolcsanyi, J. (1987). Selective responsiveness of polymodal nociceptors of the rabbit ear to capsaicin, bradykinin and ultra-violet irradiation. J. Physiol., 383:9-23.



Szolcsanyi, J., Sann, H., Pierau, F. (1986). Nociception in pigeons is not impaired by capsaicin. *Pain*, 27:247-260.

Szolcsanyi, J., Anton, F., Reeh, P.W., Handwerker, H.O. (1988). Selective excitation by capsaicin of mechano-heat sensitive nociceptors in rat skin. *Brain Res.*, 446:262-268

Toh, C. C., Lee, T. S., Kiang, A. K. (1955). The pharmacological actions of capsaicin and analogues. *Brit. J. Pharmacol.*, 10:175-182

Tominaga, M., Caterina, M. J., Malmberg, A. B., Rosen, T. A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B. E., Basbaum, A. I., Julius, D. (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*, 21:531-543

Tominaga, M., and Caterina, M. J. (2004). Thermosensation and pain. *J. Of Neurobiology*, 61(1):3-12.

Trevisani, M., Milan, A., Gatti, R., Zanasi, A., Harrison, S., Fontana, G., Morice, A.H., Geppetti, P. (2004). Antitussive activity of iodo-resiniferatoxin in guinea pigs. *Thorax*, 59(9):769-772.

Trott, O. and Olson, A. J. (2009). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comp. Chem.*, 31(2):455-461

Ursu, O., Rayan, A., Goldblum, A., Oprea, T. I. (2011). Understanding drug-likeness. *WIREs Comp. Mol. Science*. 1(5):760-781

Van Drie, J.H. (1997). Strategies for the determination of pharmacophoric 3D database queries. *J. of Comp-Aid. Mol. Des.*, 11:39-52.

van Heel, M., Gowen, B., Matadeen, R., Orlova, E., Finn, R., Pape, T., Cohen, D., Stark, H.,

Schmidt, R., Schatz, M., Patwardhan, A. (2000) Single-particle electron cryo-microscopy: towards atomic resolution . *Quart. Rev. of Biophys.*, 33(4):307–369

Vandenberg, J. and Waxman, G. (2012). Hodgkin and Huxley and the basis for electrical signalling: a remarkable legacy still going strong. *J Physiol*, 590(11):2569–2570

Vanommeslaeghe, K., Hatcher, E., Acharya, C., Kundu, S., Zhong, S., Shim, J., Darian, E., Guvench, O., Lopes, P., Vorobyov, I., MacKerell, AD. (2010). CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *J. Comput. Chem.* 31:671–690.

Walpole, C., Bevan, S., Bloomfield, G., Breckenridge, R., James, I., Ritchie, T., Szallasi, A., Winter, J., Wrigglesworth, R. (1996). Similarities and Differences in the Structure-Activity Relationships of Capsaicin and Resiniferatoxin Analogues. *J. Med. Chem.*, 39:2939-2952.

Waxman, S., Samponi, G. (2014). Regulating excitability of peripheral afferents : emerging ion channel targets. *Nature*, 17(2):153-163.

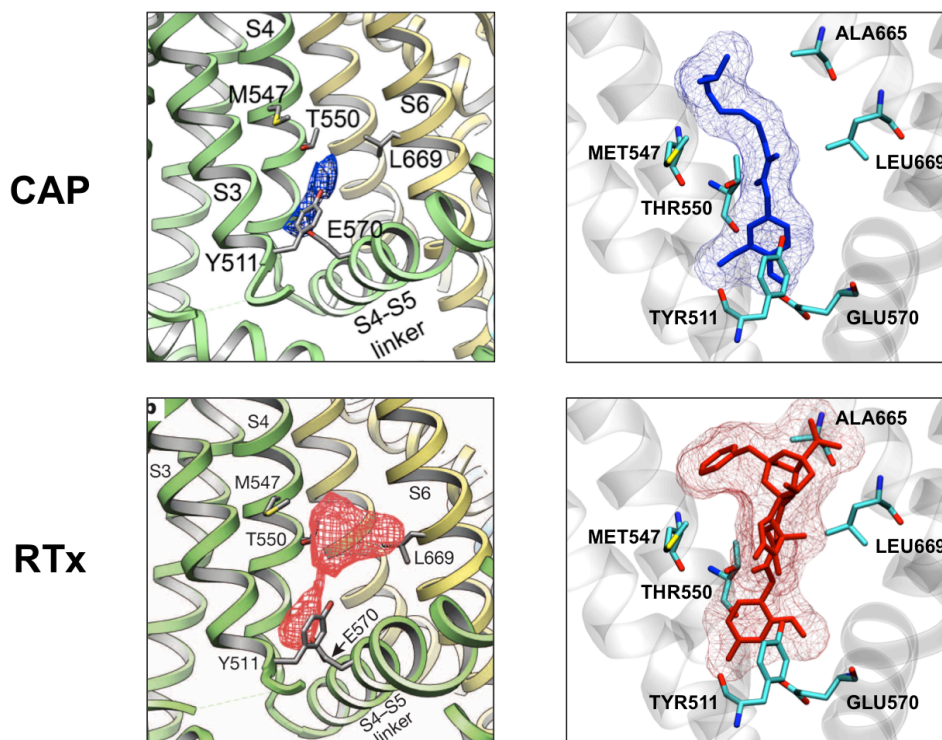
Wasik, R., Łebska, M., Felczak, K., Poznański, J., Shugar D., (2010). Relative role of halogen bonds and hydrophobic interactions in inhibition of human protein kinase CK2 $\alpha$  by tetrabromobenzotriazole and some C5-substituted analogues. *J. Phys. Chem. B.*, 114(32):10601-10611.

Winter, Z., Buhala, A., Ötvös, F., Jósvay, K., Vizler, C., Dombi, G., Szakonyi, G., Oláh, Z. (2013). Functionally important amino acid residues in the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) ion channel – an overview of the current mutational data. *Molecular Pain*, 9:30

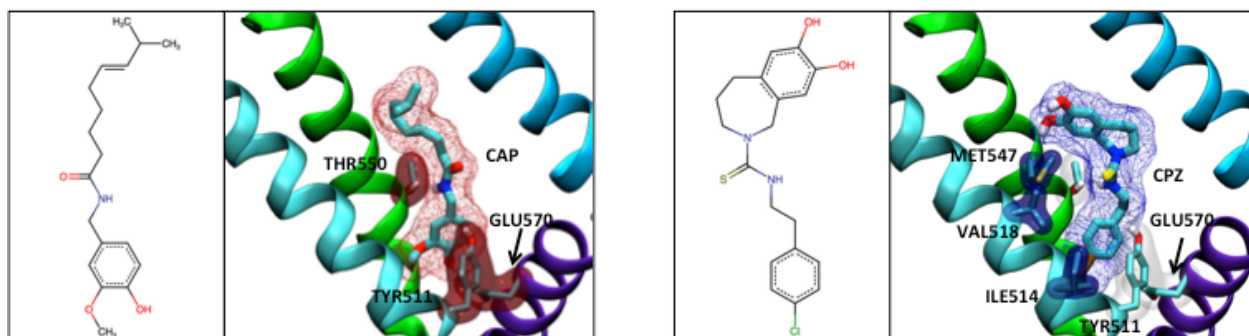
Wong, G., Gavva, N. (2009). Therapeutic potential of vanilloid receptor TRPV1 agonists and antagonists as analgesics: Recent advances and setbacks . *Brain Res. Rev.*, 60(1):267-277.



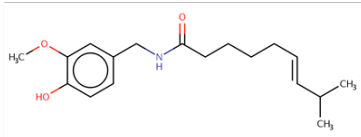
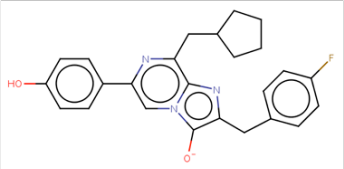
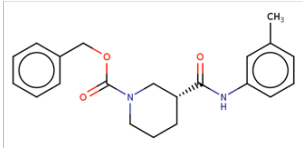
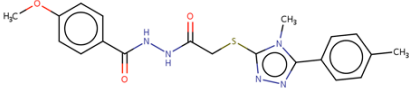
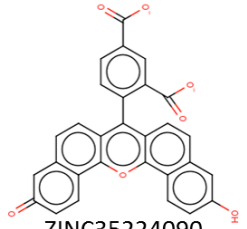
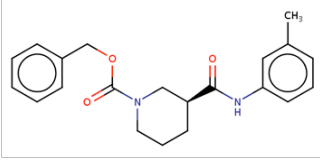
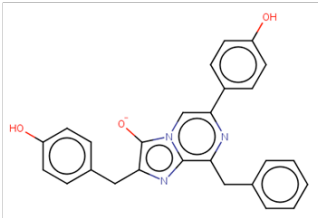
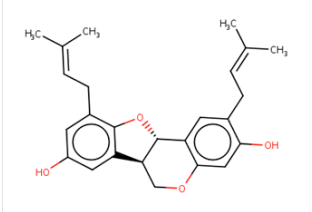
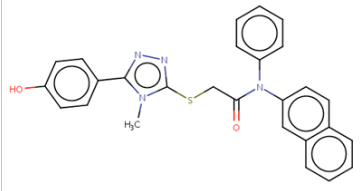
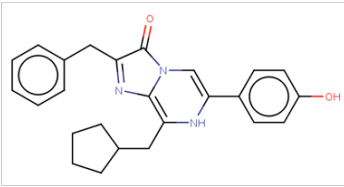
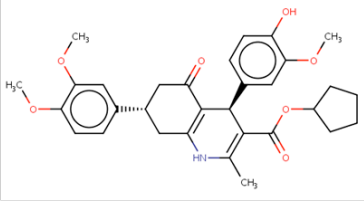
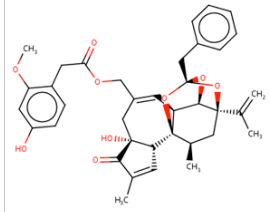
## VI. Anexos:



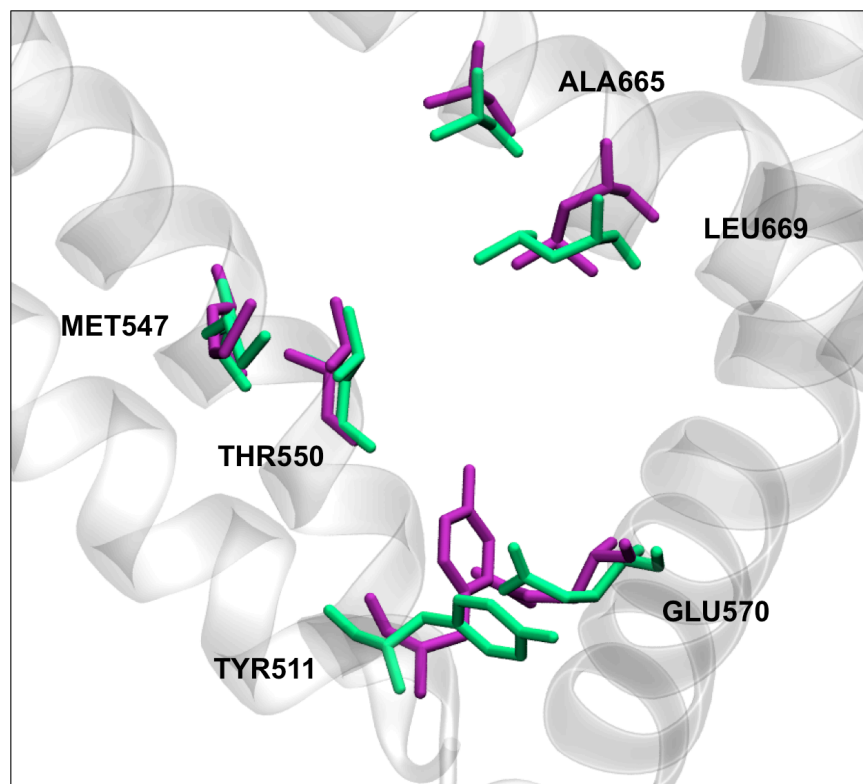
**Figura Suplementaria 1.** Densidades electrónicas atribuída a los ligandos identificadas en el sitio de unión a vaniloides en TRPV1 por criomicroscopía electrónica (CAO, et. al, 2013, Liao, *et al.*, 2013). A la derecha se observa la mejor pose de *docking* obtenida para cada uno de los ligandos.



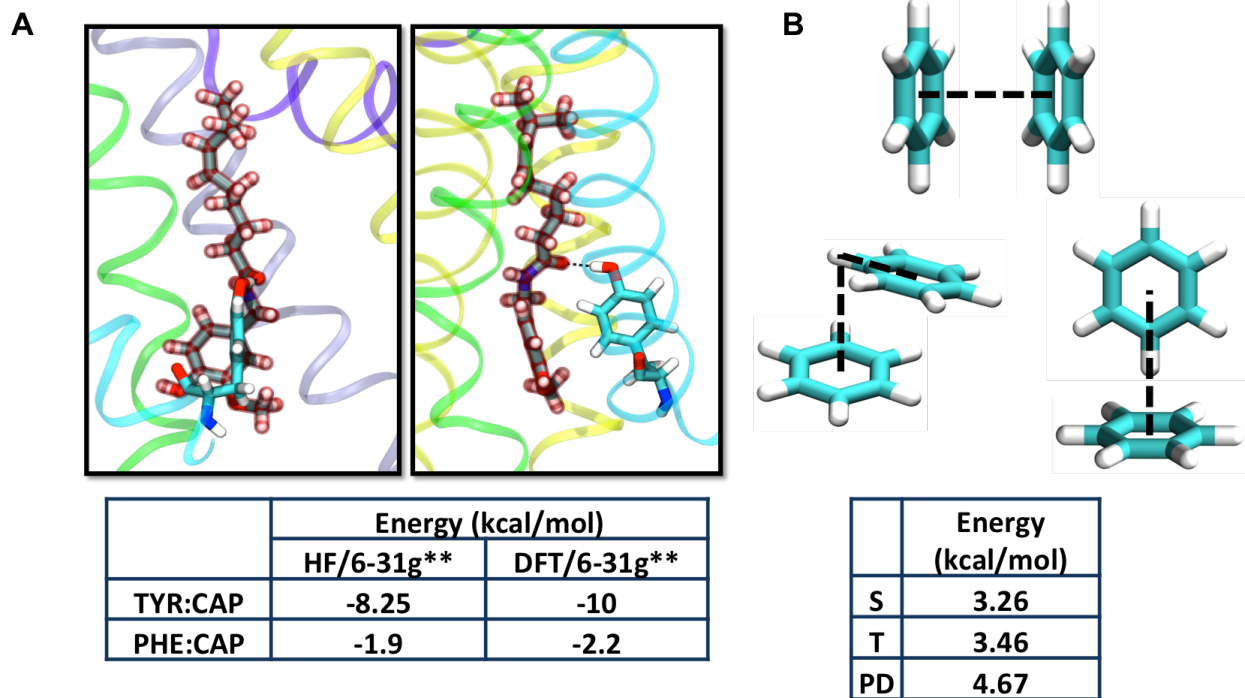
**Figura Suplementaria 2.** Comparación entre el modo de unión de Capsaicina y Capsacepina. Los residuos coloreados representan aquellos que fueron identificados como relevantes para la sensibilidad a capsaicina (rojo) y capsacepina (azul).

 <p><b>Capsaicina</b></p>	 <p><b>ZINC71774691</b></p>	 <p><b>ZINC91690162</b></p>
 <p><b>ZINC00876290</b></p>	 <p><b>ZINC35224090</b></p>	 <p><b>ZINC91690164</b></p>
 <p><b>ZINC00895447</b></p>	 <p><b>ZINC04716536</b></p>	 <p><b>ZINC00649393</b></p>
 <p><b>ZINC02507574</b></p>	 <p><b>ZINC00650347</b></p>	 <p><b>Resiniferatoxina</b></p>

**Figura Suplementaria 3.** Estructura de los ligandos mostrados en la Tabla 1. Se muestran las estructuras de cada uno de los 10 mejores ligandos, incluyendo a capsaicina y resiniferatoxina.



**Figura suplementaria 4.** Comparación del bolsillo de unión a vaniloides en ausencia y presencia de agonistas. Para mayor claridad solo se muestran las estructuras del canal TRPV1 en ausencia de agonistas (verde) y en presencia de resiniferatoxina y la toxina de doble nudo (morado).



**Figure 5.** Interacciones observadas entre el anillo de capsaicina y el anillo aromático de TYR511. **A.** Se muestra la geometría de la interacción en el panel superior y las energías de interacción calculadas en dos niveles de teoría diferentes en el panel inferior. **B.** Energía de las configuraciones entre distintas configuraciones de dímeros de benceno según lo reportado por Sinnokrot (2002). S: tipo sandwich, T: forma de T y PD: paralela desplazada.